



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Claves atrayentes de la avispa invasora *Sirex noctilio* (Hymenoptera: *Siricidae*)”

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

Lic. Santiago Masagué

Director de tesis: Dr. Andrés S. Martínez von Ellrichshausen

Co-Director de tesis: Dr. Sebastián A. Minoli

Consejero de Estudios: Dr. Pablo E. Schilman

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Bariloche (IFAB)

Buenos Aires, 3 de Julio del 2023

Agradecimientos

En primer lugar, a todxs mis compañerxs del GEPI, con quienes compartí día a día todo este proceso. Me llevo amistades, risas, discusiones enriquecedoras y tantos momentos lindos. Particularmente a Gera y Anita, quienes me han ayudado desde el comienzo en esto que significaba un gran desafío a nivel personal. A Anto, con quien no sólo compartí oficina, sino también tantas jornadas, charlas y momentos de aguante (Te odio...jej).

A mi director, Andrés Martínez, por haber confiado en mí y haberme acompañado en todo momento. A José (que siempre estuvo) y Juan, quienes permitieron también que me incorpore a este proyecto.

A INTA, CONICET y Agencia (FONCyT) por el apoyo institucional.

A la Universidad (pública) de Buenos Aires. Particularmente a la FCEyN, el DBBE y a los integrantes de la comisión de seguimiento de tesis, Fer Locatelli y Dani Medesani, por el apoyo académico e institucional.

Al personal de apoyo del IFAB, quienes fueron fundamentales para el desarrollo de muchas de las tareas llevadas a cabo.

A todxs lxs que se han puesto a disposición y han colaborado para que muchos de los estudios de laboratorio hayan podido realizarse: Pato Fernández (Agronomía, UBA); Diego Segura y Francisco Devescovi (Instituto de Genética 'Ewald A. Favret', INTA-Castelar); Axel Bruchhausen y Guillermo Rozas (Laboratorio de fotónica y optoelectrónica, C.A.B.).

A todxs lxs que han colaborado y permitido que se lleven a cabo las actividades de campo que resultaron fundamentales para este trabajo: Comunidad Linares (Néstor Guerrero como interlocutor); AER-INTA Chos Malal (Ale Mogni); Fortín Chacabuco; a los productores de Meliquina, Aluminé y Arroyo del Medio (Bariloche).

Por último, lo más importante, la familia...

Mi familia de sangre... mis viejxs, mi hermanita, abuelxs, tíxs y primxs. Siempre han sido mi principal apoyo y mi referencia. Y mi familia de la vida... mis grandes amigxs. Lxs de siempre, lxs que me dió Barí...todxs.

En fin, más allá de los nombres y referencias explícitas, a todos los que estuvieron cerca durante estos años y han sido parte de todo esto. Fueron años de mucho aprendizaje y crecimiento (profesional y personal), que no hubiera podido afrontar sin el acompañamiento de todas estas personas. GRACIAS y... ¡Aguante el aguante!

Índice general

Resumen	1
Abstract4
Capítulo 1. Introducción general	7
1.1 Invasiones biológicas	7
1.2 Manejo de plagas forestales.....	14
1.3 Monitoreo: seguimiento y predicción	19
1.4 Ecología sensorial	21
1.5 Modelo de estudio: <i>Sirex noctilio</i>	25
1.6 Objetivos.....	38
1.7 Hipótesis y predicciones	40
1.8 Resumen del proyecto.....	42
Capítulo 2. Comportamiento olfativo de <i>Sirex noctilio</i> frente al hongo simbiote <i>Amylostereum areolatum</i> en distintos medios de crecimiento	43
2.1 Introducción	43
2.2 Materiales y métodos.....	48
2.3 Resultados	52
2.4 Discusión.....	56
Capítulo 3. Respuesta antenal de <i>Sirex noctilio</i> hacia compuestos volátiles emitidos por el hongo simbiote <i>Amylostereum areolatum</i> en distintos medios de crecimiento	60
3.1 Introducción	60
3.2 Materiales y métodos.....	64
3.3 Resultados	69
3.4 Discusión.....	75
Capítulo 4. Respuesta de hembras de <i>Sirex noctilio</i> hacia estímulos visuales.....	81
4.1 Introducción	81
4.2 Objetivos.....	86
4.3 Materiales y métodos.....	87
4.4 Discusión.....	98
Capítulo 5. Respuesta de hembras de <i>Sirex noctilio</i> hacia el anisaldehído, volátiles del hospedador y claves visuales	102
5.1 Introducción	102
5.2 Materiales y métodos.....	105

5.3	Resultados	111
5.4	Discusión.....	116
Capítulo 6.	Discusión general y conclusiones finales	119
	Índice de figuras.....	128
	Índice de tablas.....	130
	Bibliografía	131

Resumen

En un contexto de creciente globalización, las invasiones biológicas y el número de plagas han aumentado notablemente. La avispa de los pinos, *Sirex noctilio*, es una importante plaga forestal endémica de Eurasia que, durante el siglo XX, ha demostrado un gran potencial invasor. En algunas de las regiones introducidas, la avispa se ha convertido en una plaga primaria de los pinos, ya que es capaz de causar la muerte rápida del árbol infectado y reducir significativamente la calidad de su madera, debido principalmente al crecimiento del hongo simbiótico *Amylostereum areolatum*. Una cuestión crítica para el éxito de la gestión de esta especie es el monitoreo de la población. En este sentido, los mecanismos de detección deben emplear a menudo métodos altamente sensibles (por ejemplo, trampas cebadas con semioquímicos y coloraciones específicas) para aumentar las probabilidades de detectar individuos cuando sus densidades son aún bajas. Por este motivo, en este trabajo se realizaron estudios sobre la ecología sensorial (es decir, química y visual) de la especie, con el objetivo último de desarrollar herramientas sostenibles para la gestión eficiente de la plaga.

En primer lugar, en el **Capítulo 2**, se evaluó la respuesta comportamental de las hembras de *S. noctilio* bajo la hipótesis de que utilizan los volátiles de su simbiote fúngico *Amylostereum areolatum* y del pino para detectar árboles previamente atacados. La detección de un árbol previamente atacado, seguida por la oviposición (y por tanto la agregación del ataque a nivel de árbol), podría ser ventajosa para el desarrollo larvario, tanto nutricionalmente como en cuanto a las posibilidades de superar las defensas del árbol multiplicando la inoculación del hongo y del veneno fitotóxico. Se evaluó, mediante ensayos de olfatometría, la relevancia de los volátiles emitidos por el hongo creciendo en diferentes condiciones (medio artificial o madera de dos árboles hospedadores: *Pinus contorta* y *Pinus ponderosa*) sobre el comportamiento de las hembras adultas de *S. noctilio*. Los resultados mostraron que, ambas especies de pino con el hongo en crecimiento, resultaron altamente atractivas (vs. aire). Los resultados globales mostraron además una clara jerarquía en cuanto a la preferencia de las hembras por los estímulos evaluados, evidenciándose la mayor respuesta hacia el hongo que crecía en la

especie de pino preferida: *P. contorta*. Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia tanto del simbiote como de los volátiles de la madera de pino en el comportamiento de las avispas hembra. En este contexto, se propone que las respuestas comportamentales podrían ser el resultado del efecto combinado de olores de fondo (madera del hospedador) y olores indicadores de recursos (OIRs: simbiote fúngico). Por último, en cuanto a la preferencia hacia una de las especies hospedadoras, es bien sabido que la exposición durante las etapas pre-emergencia y/o tempranas de los adultos a una determinada especie/cultivar hospedadora, pueden afectar a las preferencias olfativas en etapas posteriores del ciclo biológico. Por lo tanto, los resultados obtenidos podrían estar asociados a experiencias tempranas con el hospedador natal, ya que todas las hembras utilizadas en los bioensayos se obtuvieron de árboles de *P. contorta* infestados. Alternativamente, las hembras podrían mostrar una preferencia innata por este quimiotipo.

En segundo lugar, en el **Capítulo 3** (bajo la misma hipótesis que en el capítulo anterior), se analizó la respuesta antenal (Cromatografía de Gases-Electroantenografía) de las hembras hacia los volátiles individuales emitidos por las mismas fuentes utilizadas en los ensayos comportamentales. Los resultados indican que las hembras perciben diferentes perfiles volátiles en función de la fuente evaluada. Se detectaron compuestos particulares que podrían ser relevantes en un posible contexto de olores de fondo - OIRs y posibles atrayentes específicos para las hembras de *S. noctilio*.

En tercer lugar, el **Capítulo 4** describe las investigaciones realizadas sobre las posibles señales visuales que podrían estar complementando la respuesta de atracción química de las hembras de *S. noctilio*. Mediante estudios de reflectancias, se analizaron las coloraciones de posibles fuentes de información visual relevante en un contexto biológico y ecológico de las hembras (es decir, el color de la corteza del pino, el abdomen del macho, las acículas cloróticas). Mediante este método, se seleccionaron los colores comerciales que más se asemejaban a los colores naturales y se evaluó en el campo la respuesta de las hembras a las trampas con dichas coloraciones. Los resultados sugieren que las trampas con una combinación de colores de corteza podrían potenciar la atracción de los insectos hacia las trampas con cebo químico.

Por último, en el **Capítulo 5**, se propuso que debía existir un compuesto particular (en este caso, el anisaldehído) emitido por el simbionte fúngico capaz de atraer a las hembras de *S. noctilio*, y que, en combinación con los volátiles del hospedador y señales visuales particulares, potenciarían la atracción. Se demostró, por primera vez, la atracción comportamental de las hembras hacia el anisaldehído mediante pruebas de olfatometría en laboratorio (vs. aire). Además, se demostró que este compuesto es aún más atractivo que el hongo creciendo en medio artificial e incluso que la trementina (una sustancia que contiene volátiles del hospedador y es utilizada como cebo en las trampas). También probamos en el campo la eficiencia de captura de trampas panel, incluyendo información química y visual que pudiera resultar atractiva. Para las señales visuales, colocamos trampas negras (control) y con una combinación de coloraciones de la corteza. Además, cebamos las trampas con: trementina (es decir, volátiles de pino como olores de fondo), anisaldehído (es decir, olores fúngicos como OIRs) o una combinación de ambos (olores de fondo+OIRs).

El presente trabajo pone de relieve la complejidad del mundo químico en el que navegan las hembras de *S. noctilio* y las claves visuales que podrían utilizar para localizar hospedadores y sitios de oviposición adecuados. Deberán realizarse futuros estudios para evaluar si las diferencias observadas en los niveles de atracción hacia las fuentes volátiles analizadas son producto del aprendizaje temprano de las avispas o se deben a respuestas innatas. En este contexto, si las experiencias tempranas afectan al comportamiento en etapas posteriores de las hembras de *S. noctilio*, debería prestarse atención al perfil químico de las especies de pino de monocultivo, ya que se podría maximizar el poder de atracción del cebo en función de las variaciones regionales de las especies. Los resultados indican que los semioquímicos del simbionte resultan altamente relevante para las hembras de *S. noctilio*. Además, aunque existen pruebas sustanciales del potencial del anisaldehído como posible atrayente químico y claves visuales que sugieren su relevancia, serán necesarios más estudios para confirmarlo. Una mayor comprensión de las bases químicas y visuales del comportamiento de las hembras de *S. noctilio* guiará el desarrollo de señuelos altamente atractivos y específicos para maximizar la atracción de las avispas en los programas de gestión de la vigilancia.

Abstract

"Attractive cues for the invasive wasp *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae)."

In a context of increasing globalization, biological invasions and the number of pests have increased markedly. The pine wasp, *Sirex noctilio*, is a major forest pest endemic to Eurasia that, during the 20th century, showed great invasive potential. In some of the introduced regions, the wasp has become a primary pest of pine trees, as is capable of causing rapid death of the infected tree and significantly reducing the quality of its wood, mainly due to the growth of the symbiotic fungus, *Amylostereum areolatum*. A critical issue for successful management of this species is population monitoring. In this sense, detection mechanisms must often employ highly sensitive methods (e.g. traps baited with specific semiochemicals and colorations) to increase the probabilities of detecting individuals when their densities are still low. For this reason, in this work, studies were conducted on the sensory ecology (i.e. chemical and visual) of the species, with the aim of developing sustainable tools for the efficient management of the pest.

Firstly, in **Chapter 2**, the behavioral response of *S. noctilio* females was tested under the hypothesis that they use volatiles from their fungal symbiont *Amylostereum areolatum* and pine tree to detect previously attacked trees. The detection of a previously attacked tree, followed by oviposition (and thus aggregation of the attack at the tree level), could be advantageous for larval development, both nutritionally and in terms of the possibilities of overcoming the tree's defenses by multiplying the inoculation of the fungus and phytotoxic poison. The relevance of the volatiles emitted by the fungus growing in different conditions (artificial medium or wood from two host trees: *Pinus contorta* and *Pinus ponderosa*) on the behavior of *S. noctilio* adult females, was tested by olfactometry assays. Results showed that both pine species with the growing fungus were highly attractive (vs. air). The global results also showed a clear hierarchy in terms of female preference for the tested stimuli, with the highest response evidenced toward the fungus growing in the preferred pine species: *P. contorta*. These results highlight the relevance of both symbiont and pine wood volatiles in the oviposition behavior of female wasps. In this

context, it is proposed that behavioral responses could be the result of the combined effect of background odors (host wood) and resource indicator odors (RIOs: fungal symbiont). Finally, the preference towards one of the host species, it is well known that pre-emergence and early exposure of adults to a given host species/cultivar can affect olfactory preferences in later stages of the life cycle. Therefore, the obtained results could be associated with early experiences with the natal host, since all females used in the bioassays were obtained from *P. contorta* infested trees. Alternatively, females could show an innate preference for this chemotype.

Secondly, in **Chapter 3** and under the same hypothesis as in the previous chapter, the antennal response (Gas Chromatography-Electroantennogram detection) of females toward the individual volatiles emitted by the same sources used in the behavioral tests, was analyzed. Results indicate that females perceive different volatile profiles depending on the tested source. Particular compounds that could be relevant in a possible context of background odors - RIOs and possible specific attractants for *S. noctilio* females were detected.

In third place, **Chapter 4** describes investigations on possible visual cues that could be complementing the chemical attraction response of *S. noctilio* females. Through reflectance studies, colorations of possible sources of relevant visual information in a biological and ecological context of females (i.e. pine bark color, male abdomen, chlorotic needles) were analyzed. By this method, commercial colors that most closely resembled natural colors were selected and the females' response to traps with these colorations was established in the field. The results suggest that traps with a combination of bark colors could enhance the attraction of insects to chemically baited traps.

Finally, in **Chapter 5**, it was proposed that there must be a particular compound (i.e. anisaldehyde) emitted by the fungal symbiont capable of attracting *S. noctilio* females, and that in combination with host volatiles and particular visual cues, could enhance the attraction. The behavioral attraction of females to anisaldehyde was shown for the first time by olfactometry tests in the laboratory (vs. air). Moreover, it was shown that this compound is even more attractive than the fungus growing in artificial medium and even than turpentine (a substance containing host volatiles used as bait in traps). We also tested in the field the capture efficiency of the panel traps, including

chemical and visual information that could be attractive. For visual cues, we set black traps (control) and with a combination of bark colorations. In addition, we baited the traps with: turpentine (i.e. pine volatiles as background odors), anisaldehyde (i.e. fungal odors as OIRs) or a combination of both (background odors+OIR).

The present work highlight the complexity of the chemical world in which *S. noctilio* females navigate and the visual cues they could use to locate suitable hosts and oviposition sites. Future studies should be conducted to assess whether the observed differences in attraction levels to the volatile sources analyzed are a product of early wasp learning or due to innate responses. In this context, if early experiences affect the later stage behavior of *S. noctilio* females, attention should be paid to the chemical profile of monoculture pine species, as it could maximize lure attractiveness according to regional species variations. The results showed that the symbiont semiochemicals are highly relevant to *S. noctilio* females. Furthermore, although there is substantial evidence for the potential of anisaldehyde as a potential chemical attractant and visual cues suggesting its relevance, further studies will be needed to confirm this. Further understanding of the chemical and visual basis of *S. noctilio* female behavior will guide the development of highly attractive and specific lures to maximize wasp attraction in surveillance management programs.

Capítulo 1. Introducción general

1.1 Invasiones biológicas

Las invasiones biológicas se refieren generalmente al proceso de introducción, establecimiento y dispersión de especies procedentes de otras áreas geográficas. La mayoría de estas invasiones han sido ocasionadas por introducciones accidentales, pero en otros casos han sido intencionales. El movimiento de individuos/organismos de una misma especie desde ciertas regiones a otras se ha llevado a cabo desde tiempos inmemoriales, sin embargo, los movimientos humanos, la intensificación del comercio, la alteración de los ecosistemas y el mayor desarrollo han acelerado el proceso (Vilá et al., 2008; Simberloff & Rejmanek, 2011). En consecuencia, a lo largo del siglo 20, las invasiones biológicas y las investigaciones que abordan este fenómeno han aumentado notablemente (Ricciardi & Mac Isaac, 2008).

1.1.1 Introducción a las invasiones biológicas

A medida que la ciencia de la biología de las invasiones ha crecido, los investigadores han ido utilizando una variedad de terminologías, sinónimos para el mismo proceso, diferentes definiciones del mismo término, y desarrollando y diseccionando el proceso de invasión de diferentes maneras (Lockwood et al., 2013). En cuanto al proceso de invasión propiamente dicho, existe una gran cantidad de enfoques (entre otros: Williamson, 1996; Richardson et al., 2000). La mayoría de los ecologistas animales, adoptan marcos del proceso de invasión que son modificaciones de uno propuesto por primera vez por Williamson (por ejemplo, Kolar & Lodge, 2001; Blackburn et al., 2009; Davis, 2009), que ve las invasiones como una serie de “etapas” por las que debe pasar una especie en el camino de nativo a invasivo. Estas etapas, son básicamente las siguientes: 1) transporte, 2) introducción, 3) establecimiento y 4) dispersión (Figura 1).

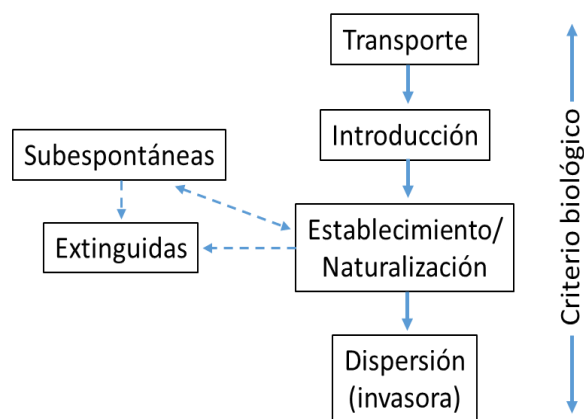


Figura 1. Etapas del proceso de invasión.

Existen además numerosos factores importantes asociados al proceso de invasión (invasividad de la especie, invasibilidad del ambiente, esfuerzo de introducción, etc.). Algunos de estos conceptos serán expuestos durante este trabajo en el marco de las invasiones biológicas y el manejo de plagas forestales. Sin embargo, no es el objetivo de este estudio enfatizar o desarrollar específicamente dichos elementos.

En principio, nos parece necesario referirnos brevemente acerca de los posibles impactos que pueden ocasionar las especies invasoras. Esto justifica, en última instancia, el esfuerzo por realizar estudios que permitan desarrollar herramientas eficientes para el manejo y control de especies que pudieran significar un riesgo.

Es ampliamente reconocido que una minoría de las invasiones tienen impactos “dañinos”. Los críticos, por ejemplo, Davis et al., (2011), toman ese hallazgo como evidencia de que todo el problema de la invasión está exagerado. Sin embargo, algunos autores sostienen que existen tres razones por las que las estadísticas sobre los impactos de las invasiones conocidas deben interpretarse con precaución (Simberloff et al., 2013a). Primero, la gran mayoría de las poblaciones introducidas no han sido estudiadas en detalle, por lo que su verdadero impacto es aún desconocido (Vilà et al., 2010). Segundo, en varios casos las invasiones son sustanciales e incluso afectan ecosistemas enteros, pero sus impactos son sutiles y no evidentes (Vitousek, 1986; Vitousek et al., 1987; Ehrenfeld, 2010). Tercero, muchas poblaciones introducidas permanecen más o menos restringidas e inocuas por largos períodos, a menudo varias décadas, antes de explotar abruptamente a través del paisaje con amplias consecuencias (Gassó et al., 2010; Crooks et al., 2011; Essl et al., 2011). Otra cuestión que hay que tener en cuenta

nuevamente, es que muchas veces, la percepción acerca de un impacto está estrechamente relacionada con una apreciación “social” de dicho evento (Mack & D’Antonio, 1998; Galil, 2007; Emmett Duffy, 2009; Davis et al., 2011; Schlaepfer et al., 2011; Simberloff et al., 2012).

Solo hay dos estimaciones del costo total de las especies invasoras a nivel nacional, ambas relacionadas con los Estados Unidos. En 1993, la Oficina de Evaluación Tecnológica de los Estados Unidos (OTA) estimó que los costos de daños de 79 especies particularmente dañinas en los últimos 85 años fueron de \$97 mil millones. Siete años después, Pimentel et al. (2000) estimaron que el costo anual de daños de un conjunto mucho más amplio de especies invasoras es de \$137 mil millones. La diferencia entre estas estimaciones refleja un crecimiento en la preocupación por el problema tanto como una mejora en la precisión de la estimación. A nivel de las especies exóticas introducidas individuales, hay una serie de estimaciones razonablemente buenas, aunque selectivas, de daños o costos de control (Anaman, 1994; Khalanski, 1997; Bangsund et al., 1999; Knowler & Barbier, 2000; Watkinson et al., 2000).

Los costos económicos totales de las invasiones biológicas también incluyen los efectos de los invasores en los ecosistemas del huésped y en las poblaciones humanas que dependen de ellos. Actualmente no existen estimaciones sobre el valor de los efectos más generalizados de las invasiones. Por ejemplo, en el Convenio sobre la Diversidad Biológica, se asumió que las especies invasoras son una de las principales causas inmediatas de extinción en todo el mundo (Glowka et al., 1994). También han interrumpido funciones ecológicas clave en muchos sistemas, con implicancias de largo alcance para las actividades económicas respaldadas por esos sistemas (Heywood, 1995). De hecho, la mayoría de los tipos de ecosistemas se han visto afectados en mayor o menor medida por las invasiones (Parker et al., 1999; Williamson, 1999). Ya en la década del 50, Charles S. Elton advirtió sobre los impactos que las especies exóticas podían causar en los ecosistemas (Elton, 1958). La creciente lista de casos bien estudiados de impactos en poblaciones es enorme (por ejemplo, Simberloff & Rejmanek, 2011). Aunque se han reconocido algunos impactos que afectan a comunidades y ecosistemas enteros desde al menos la década de 1980 (Vitousek et al., 1987), se han hecho más evidentes a medida que la ciencia de la invasión ha

pasado de centrarse principalmente en los impactos en especies particulares, a los impactos acumulativos en los ecosistemas (Ehrenfeld, 2010). El creciente énfasis en los impactos de la comunidad y el ecosistema ha revelado efectos importantes, a veces insospechados, de las presentaciones de todos los principales grupos tróficos (Wardle et al., 2011; Kimberg et al., 2014; Alonso Fernández & Castro Díez, 2015; García-Berthou et al., 2015; Habit et al., 2015). Sin embargo, las implicaciones económicas de estos impactos indirectos aún no se han identificado.

A nivel macro, la apertura de la economía de un país, la composición de sus flujos comerciales, sus regímenes reguladores y otros factores, lo hacen más o menos vulnerable a las invasiones de especies exóticas. Las vías de invasión y la frecuencia con la que las especies exóticas se introducen en los ecosistemas vulnerables dependen de los patrones de comercio y viaje. La probabilidad de establecimiento de especies introducidas intencionalmente es mayor que la de especies introducidas involuntariamente (Lonsdale, 1994; C. S. Smith et al., 1999). Las especies exóticas que se comercializan durante un período de tiempo tienen una mayor probabilidad de establecimiento que las que se comercializan una vez (Enserink, 1999). Del mismo modo, las especies que se introducen repetidamente como efectos secundarios del comercio y los viajes (por ejemplo, especies transportadas en el agua de lastre o en el equipaje de los pasajeros) tienen más probabilidades de establecerse que las introducidas solo una vez. Nótese que nos estamos refiriendo al concepto presentado anteriormente, conocido como esfuerzo de introducción (o presión de propágulo). El crecimiento en el volumen y la complejidad del comercio internacional, combinado con la liberalización de los regímenes reguladores para alentar el comercio, ha incrementado a la vez la frecuencia de introducciones a lo largo de las rutas existentes, el número de nuevas rutas y la facilidad con la que las especies potencialmente invasoras pueden avanzar. La desregulación de los mercados nacionales e internacionales ha reducido las barreras al comercio y la vigilancia del comercio, aumentando así los riesgos de invasiones. Al mismo tiempo, el comportamiento humano, las normas sociales y las tradiciones culturales se han adaptado solo lentamente a los nuevos riesgos, y esto, a su vez, ha aumentado el impacto de las invasiones (Perrings et al., 2002).

Teniendo en cuenta que actualmente la probabilidad de introducir especies exóticas (o de modificar el ambiente de manera importante) es cada vez mayor. Y en vista de que muchas de las especies con potencial invasor pueden provocar modificaciones muy importantes en todos los niveles ecosistémicos y por lo tanto convertirse en plagas. La siguiente pregunta que cabría hacerse entonces es, ¿a qué se considera una plaga?

1.1.2 ¿Qué es una plaga?

El concepto de plaga estuvo ligado desde sus inicios a la agricultura y ha evolucionado con el tiempo. Según la Real Academia Española, el término plaga se refiere a la aparición masiva y repentina de seres vivos de la misma especie que causan graves daños a poblaciones animales o vegetales. Existen también definiciones más amplias, que consideran como plaga a todo organismo que dañe la salud, el bienestar y los recursos de otro ser vivo. En este sentido, la propia humanidad constituye en sí misma una plaga que amenaza no sólo con la destrucción de la biosfera sino incluso con la propia supervivencia del hombre (Rey, 1976). Básicamente, el hombre aplica este término a todo aquello que le produce daño. Más aún, una plaga suele ser reconocida tan solo por el daño que puede ocasionar, o dicho de otra forma, según el grado en el que el perjuicio se aprecia o tolera; por tanto, existe un nivel o umbral económico (generalmente, también podría ser ecológico) por encima del cual una población es perjudicial, y viceversa. Bajo este punto de vista, la definición más pertinente podría ser entonces la de Rey, (1976): *'plaga es todo lo que el hombre considera que es plaga'*. Es importante destacar también que, según las definiciones tradicionales, suele hacerse énfasis particularmente en las “especies plaga”. Existe entonces otro concepto que deja a un lado la concepción según la cual la especie que se considera como dañina debe señalarse como plaga *per se*, y establece que debe entenderse como plaga una “situación” en la cual un ente biótico produce daños económicos, normalmente físicos, a intereses de las personas (salud, plantas cultivadas, animales domésticos, materiales o medios naturales); es decir, si existe la especie potencialmente dañina y se dan las condiciones ecológicas que permiten el desarrollo de poblaciones que creen una situación de riesgo, se está ante la presencia de una plaga. Este es operativamente un concepto ecológico que permite separar el concepto de

plaga de la especie que produce el daño, evitando establecer clasificaciones de especies 'buenas' y 'malas', y facilitando la explicación de por qué una especie es beneficiosa en un lugar y perjudicial en otro (Monge, 2007). Según lo expuesto hasta aquí, debe notarse que el término 'plaga' tiene un sentido marcadamente antrópico y que prácticamente todas sus definiciones incluyen el elemento económico para separar el instante en el cual una población (en determinada situación ecológica) puede ser considerada como plaga (Figura 2). Muchas veces se consideran como sinónimos los términos de "especies invasoras" y "especies plaga". Y más allá de que hemos planteado que los impactos suelen ser inherentes a los procesos de invasión, debemos remarcar que esta equivalencia no siempre es del todo correcta y que depende exclusivamente de cómo podamos observar o percibir dichos impactos en una situación de invasión. Dicho esto, hablaremos ahora (de manera general) del control y manejo de especies invasoras con potencial de convertirse en plagas. Para luego referirnos específicamente al manejo de plagas forestales.

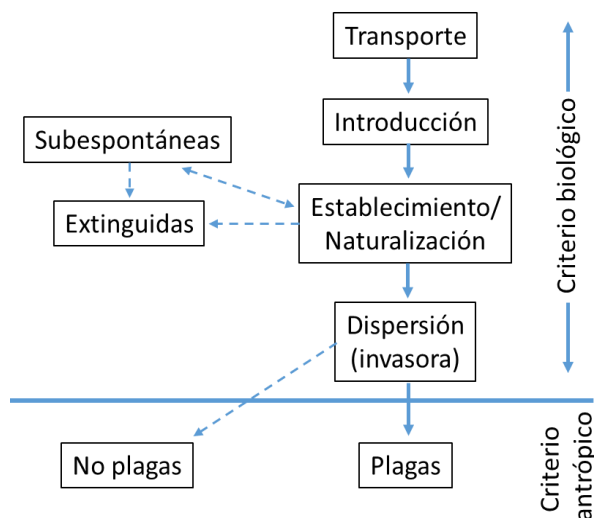


Figura 2. Etapas del proceso de invasión, en este caso, con la situación en la cual los organismos implicados pueden convertirse en plagas.

1.1.3 Manejo de especies invasoras-potenciales plagas

La posible sucesión de los impactos negativos y de gran alcance de las invasiones, sugiere que las introducciones justifican una gran precaución. Se necesitan mayores esfuerzos para detectar vías y vectores que traen situaciones

no deseadas y detectar invasores rápidamente. En el momento en que se observan los impactos, pueden haberse producido cambios irreversibles (Vilà et al., 2011) o las medidas paliativas pueden ser demasiado costosas o imposibles (Rejmánek & Pitcairn, 2002). Los principios rectores sobre especies invasoras adoptados por el Convenio sobre la Diversidad Biológica (2002) reflejan estos hallazgos: la prevención es la respuesta prioritaria; la detección temprana, la respuesta rápida y la posible erradicación deben seguir cuando la prevención falla. La gestión a largo plazo es la última opción y las estadísticas confirman la validez de este enfoque (Simberloff et al., 2013b). La prevención puede ocurrir en diferentes etapas, como restringir las vías, interceptar movimientos en las fronteras y evaluar el riesgo de importaciones intencionales. El tratamiento mejorado del agua de lastre ejemplifica la constricción de la vía (Gray et al., 2007). Los programas de intercepción pueden reducir la presión de propágulos de posibles invasores. En Europa entre 1995 y 2004, más del 80% de las 302 especies de insectos no nativos interceptados no se establecieron en Europa (Roques & Auger-Rozenberg, 2006). Nueva Zelanda ha interceptado al menos 27 especies de mosquitos no nativos, incluidos importantes vectores de enfermedades (Derraik, 2004).

Acciones como las anteriormente descritas, pueden ser aplicadas en función a la prevención o detección de poblaciones potencialmente invasoras a nivel de fronteras, según las implicancias de cada país y sus protocolos de manejo. Sin embargo, también se pueden aplicar acciones a escalas menores, por ejemplo, una plantación en donde se desea prevenir la aparición de nuevos organismos “dominantes”, evaluar la capacidad de dispersión de los mismos y más aún, conocer la dinámica poblacional de poblaciones que ya se encuentran en un sitio. Estos conocimientos, serían importantes para monitorear la presencia de distintos organismos en un determinado sitio, pero particularmente para la detección, el control y el manejo de especies plagas (o con potencial de convertirse en plagas).

1.2 Manejo de plagas forestales

1.2.1 Introducción

El manejo de plagas forestales difiere en varios aspectos importantes del manejo de plagas de cultivos agrícolas o de los que afectan los árboles de huerta. Las diferencias están relacionadas particularmente con la escala de área de la silvicultura y con los tiempos de rotación (relativamente extensos), lo cual afecta los aspectos logísticos y económicos de la gestión. Los tiempos de rotación generalmente se miden en décadas, por lo que los árboles se encuentran expuestos a una variedad de plagas y patógenos a lo largo de las distintas etapas de crecimiento. El énfasis dado a determinados métodos y la forma en que se integran en un programa de manejo de plagas depende de la naturaleza del bosque, los objetivos del manejo forestal y de las claves ecológicas o historias de vida características de las especies. Esto no quiere decir que el manejo de plagas forestales carece de principios generales, sino que la variedad de plagas, la escala y complejidad del ambiente forestal requieren un enfoque adaptativo para el manejo. En otras palabras, los detalles importan.

1.2.2 Bosques naturales y manejados

Los paisajes forestales naturales y seminaturales dominan grandes áreas geográficas en diferentes partes del mundo (FAO 2001). Las características de estos diferentes bosques, como su composición de especies, densidad, tasa de crecimiento y estructura de edad, están determinadas en gran medida por factores ambientales. Sin embargo, la mayoría de los ecosistemas forestales han sido influenciados en cierta medida por las actividades de las personas y algunos paisajes forestales han sido completamente transformados por gestión y explotación. En muchas regiones, ha habido cambios dramáticos en la extensión y características de los bosques a través de la tala o el manejo insostenible (Ledig, 1992; Niemelä & Mattson, 1996; Pimm, 1998). Más recientemente, esa tendencia se ha revertido en muchos países, pero ha resultado en paisajes boscosos dominados por rodales seminaturales o plantaciones (Koch & Skovsgaard, 1999). En Europa central, el proceso de reforestación ha convertido en efecto el bosque nativo preexistente dominado por maderas duras en bosques dominados por

coníferas (Plochmann, 1992). Las prácticas forestales con coníferas tienen una larga historia en el hemisferio norte. Sin embargo, recién a mediados del siglo pasado se aplicaron a gran escala en Europa, y posteriormente se expandieron a otras partes del mundo.

Además de restaurar los paisajes forestales, las plantaciones también juegan un papel esencial en el cumplimiento de las demandas futuras proyectadas de madera para leña, para usos estructurales e industriales y para la conversión en pulpa para la fabricación de papel (Evans, 1992, 1999; Sutton, 1999; Nambiar, 2010).

Las especies seleccionadas para el establecimiento de plantaciones reflejan las características de los sitios disponibles y el uso planificado de bosques y madera. A nivel mundial, las plantaciones de *Pinus* sp. se han expandido enormemente hasta convertirse, en comparación con las de otros árboles, en las más significativas por su extensión y beneficios económicos (Mitchell & Kirby, 1989; McEvoy, 2004; FAO, 2007).

A pesar de las muchas ventajas de los árboles exóticos en la plantación forestal, existen algunos inconvenientes. Pueden, por ejemplo, alterar el "aspecto" del paisaje y tener un impacto en los valores del paisaje y algunas especies tienen la capacidad de invadir los ecosistemas naturales y seminaturales (Higgins & Richardson, 1998; Richardson, 1998; Ledgard, 2001). Desde el punto de vista del manejo de plagas, una preocupación particular es la posibilidad que las especies arbóreas introducidas pueden ser susceptibles a las plagas y patógenos nativos (o igualmente introducidos desde su zona de origen).

1.2.3 Invasiones de insectos forestales

Cuando nuevos organismos arriban a una determinada región, a menudo hay una "fase de establecimiento" inicial durante la cual parece tener lugar una pequeña expansión desde el sitio de introducción, debido en parte al hecho de que las densidades de población son inicialmente muy bajas (Shigesada & Kawasaki, 1997). Sin embargo, antes de que las plagas se detecten, es probable que se hayan propagado durante algún tiempo. Después de esta fase inicial, la tasa de movimiento subsiguiente depende de una serie de factores diferentes, que a menudo interactúan, incluida la tasa de crecimiento de la población, el mecanismo de dispersión, la distribución de plantas hospedantes adecuadas y la dirección de los vientos predominantes.

Uno de los ejemplos más espectaculares del impacto y propagación de una plaga de insectos forestales introducida es el de la de la polilla, *Lymantria dispar* (*Lepidoptera: Erebidae*), en el este de Estados Unidos. Este insecto europeo fue importado a un suburbio de Boston por un entomólogo aficionado francés de donde se escapó hacia 1869 (Liebhold et al., 1992, 1993; Liebhold, et al., 1995; Anon, 1999).

Hace treinta años, un entomólogo francés llamado Leopold Trouvelot importó la polilla, y por accidente, algunos de los insectos se escaparon de su custodia en su propio jardín o en el de los vecinos. Si se hubieran tomado medidas rápidas, el insecto podría haber sido exterminado. Sin embargo, se extendieron muy lentamente hasta 1889, cuando los insectos se multiplicaron tanto que las orugas despojaron a todos los árboles en la vecindad y luego marcharon en ejércitos suficientes para ennegrecer las calles, en busca de alimento fresco. Este interesante suceso, pone de relieve una serie de aspectos importantes de la ecología y la gestión de una plaga introducida, en particular el período de establecimiento relativamente largo antes de que las poblaciones alcancen niveles de brote que causan daños visibles y a menudo extensos.

La introducción de la polilla, *L. dispar* en América del Norte, fue el resultado de una importación deliberada. Sin embargo, los factores más importantes que influyen en la llegada de plagas exóticas y las enfermedades son los accidentes de la historia de vida que vinculan a los organismos con el comercio o transporte internacional y “doméstico” (Caton et al., 2006; Liebhold et al., 2006; Meurisse et al., 2019). Los insectos que completan parte de su ciclo de vida en la corteza o la madera representan un riesgo particular. Las larvas de insectos de algunas familias de escarabajos (p. Ej., Bostrichidae, Buprestidae, Cerambycidae, Curculionidae, Scolytidae, Platypodidae), polillas (Sesiidae, Cossidae) y avispas (Siricidae) perforan la madera, por lo que pueden aparecer en troncos y madera importados (Wallenmaier, 1989). Sin embargo, también se pueden encontrar en la madera de baja calidad empleada en la construcción de cajas o pallets que se utilizan para transportar una gama mucho más amplia de mercancías que normalmente no están sujetas a inspección de cuarentena.

Como resultado de los movimientos comerciales internacionales de los últimos 200 años, aproximadamente, los países de todo el mundo albergan ahora muchas plagas y patógenos no nativos (Liebhold et al., 1995).

Ciertamente, no todas las especies introducidas son necesariamente plagas, pero las que lo son a veces han demostrado ser extremadamente dañinas en el nuevo entorno. Casi un tercio de las aproximadamente 70 plagas de insectos forestales importantes en Norteamérica son, de hecho, especies introducidas (Pimentel, 1986).

1.2.4 Manejo de plagas en bosques implantados

Las características de los bosques en diferentes países, así como su historia particular de explotación y manejo, han producido combinaciones distintivas de bosques naturales, seminaturales y de plantación. Estos diferentes tipos de bosque reflejan diferentes fases en el desarrollo de la gestión forestal y, a pesar de la larga historia de la explotación, todos ellos pueden seguir estando representados hoy en día dentro de un mismo país. Las características de estos diferentes bosques y las formas de explotación (y gestión), pueden influir en la naturaleza y el impacto de las plagas forestales. Su manejo efectivo dependerá del desarrollo de programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) que reconozcan las características ecológicas de las plagas, que sean apropiadas a la escala y diversidad de los bosques, así como a su valor económico y ambiental.

El MIP surge en respuesta a las tácticas de control que emplean únicamente químicos, que han resultado en la degradación ambiental, contaminación de productos alimenticios, problemas de residuos y resistencia en especies objetivo (DeBach, 1951; Stern et al., 1959). Esto perjudica seriamente la sostenibilidad (Miller & Marty, 2010). Por lo tanto, es esencial diseñar un sistema de gestión sólido, en base a principios ecológicos que den como resultado una producción sostenible sin alterar el equilibrio de la naturaleza (Overton, 1996; Lewis et al., 1997; Kennedy & Sutton, 2000). El objetivo de este nuevo enfoque es cambiar las estrategias de gestión para que sean menos dependientes de los productos químicos y más dependientes de la biología de las plagas y sus interacciones con los cultivos. Por lo tanto, el MIP que combina todos los enfoques (físicos, culturales, químicos y biológicos), es la única opción para mantener la productividad y mantener la salud de los ecosistemas (Kennedy & Sutton, 2000). Para aquellos países donde la silvicultura comercial se basa en extensas plantaciones de especies exóticas, es particularmente importante identificar y tomar las medidas apropiadas para minimizar el riesgo de introducción de plagas específicas del rango natural del árbol. Para estas plagas, el monitoreo y la calificación del riesgo pueden

aumentar la eficiencia del manejo al enfocar los esfuerzos de control en áreas clasificadas como de alto riesgo. Las sustancias químicas que modifican el comportamiento, pueden ser útiles en el monitoreo y control, pero sólo para aquellos grupos de insectos donde estas sustancias químicas de señalización juegan un papel importante en su ecología. En el caso de los puertos y otras zonas en las que se manipulan cargas de alto riesgo, puede ser necesaria una vigilancia rutinaria que incluya, por ejemplo, el uso de trampas cebadas con feromonas u otros semioquímicos específicos (J. Gibbs & Evans, 2000). Si se utilizaran varias trampas de detección dentro de la zona restringida de un puerto, podrían reducir significativamente el número de organismos que se dispersan en la zona circundante y tener así un efecto similar al de la captura masiva. Las actividades de detección pueden ampliarse para incluir los alrededores del puerto y las zonas forestales cercanas. También pueden llevarse a cabo de forma rutinaria o sólo después de cargas muy infestadas o de nuevas rutas de entrada no controladas para los organismos en cuarentena. Pueden ser necesarias inspecciones más amplias cuando parezca probable que el material infestado haya sido transportado al interior.

Cuando existen registros adecuados, a menudo es posible rastrear el movimiento del material infestado a lo largo de las principales rutas de transporte hasta las áreas de procesamiento de madera u otros sitios industriales, de modo que se pueden realizar más muestreos en los bosques que probablemente hayan estado expuestos. Las inspecciones deben diseñarse de manera que ofrezcan la mayor probabilidad de detección para un esfuerzo determinado, y la intensidad del muestreo debe ser proporcional al riesgo percibido. El objetivo principal de los muestreos es definir la extensión de la infestación para poder iniciar un programa de gestión. Los métodos de muestreo utilizados en las inspecciones dependen en gran medida de la biología de la plaga.

La erradicación suele ser una de las principales opciones a considerar cuando se descubren por primera vez las plagas introducidas (N. Gibbs, 1996; Hosking, 1998b, 1998a; Eldridge & Simpson, 2013). Definida estrictamente, la erradicación es la eliminación de cada individuo de una especie de un área geográfica que está lo suficientemente aislada para evitar la re-invasión (Newsom, 1978; Myers et al., 1998). Sin embargo, el término

"erradicación" a veces se utiliza de manera engañosa para describir el exterminio local de una población aislada dentro de un área mucho más infestada (Dreistadt & Weber, 1989).

En los programas que se basan en el control directo con insecticidas, la fumigación es más eficaz para reducir grandes poblaciones, pero se vuelve menos eficaz a medida que la población disminuye. Por lo tanto, eliminar a los últimos individuos puede resultar desproporcionadamente costoso, tanto económicamente como en términos de impacto ambiental. Determinar el punto final de una campaña de erradicación no es sencillo porque una vez que las plagas tienen una densidad muy baja, es difícil detectarlas. La recuperación de una baja densidad de población, una dinámica poblacional explosiva y una alta capacidad de dispersión son características de muchas plagas de insectos que reducen la probabilidad de que los programas de erradicación tengan éxito. En este contexto, podemos destacar la importancia de contar con un método de monitoreo lo suficientemente sensible que permita detectar la presencia de los organismos, particularmente cuando sus poblaciones se encuentran en bajas densidades. Este es un elemento fundamental dentro del MIP, que será desarrollado a continuación.

1.3 Monitoreo: seguimiento y predicción

Una de las principales funciones del monitoreo es facilitar la toma de decisiones en el manejo de plagas. La información relevante se puede adquirir de diferentes formas y en diferentes escalas espaciales, dependiendo de la naturaleza de la plaga y el objetivo de seguimiento. Las herramientas de detección están diseñadas para obtener información sobre la presencia o ausencia de plagas. Pueden utilizarse, por ejemplo, para detectar plagas exóticas asociadas con la madera importada, revelar la presencia de plagas que están ampliando su alcance, etc.

Los mecanismos de detección a menudo deben cubrir áreas extensas y emplear métodos de alta sensibilidad (ej. el uso de trampas con cebo con semioquímicos específicos) para incrementar las posibilidades de detectar plagas a bajas densidades. En la mayoría de las situaciones, el seguimiento se realiza para avisar con antelación del aumento de la densidad de las plagas potencialmente dañinas, para proporcionar información precisa sobre el calendario de las medidas de control directo o para supervisar las poblaciones después del tratamiento.

Los brotes de plagas que ocurren en áreas aisladas (o remotas), generalmente no se detectan tan rápidamente como los brotes en bosques manejados de manera más intensiva. La detección temprana de brotes aislados puede permitir la aplicación oportuna de medidas de control en un área relativamente restringida y puede prevenir el desarrollo de brotes incontrolables de plagas eruptivas. Por esta razón, algunos servicios forestales realizan muestreos anuales de plagas y enfermedades como parte del monitoreo de la salud forestal.

En los programas a gran escala, el costo es a menudo una consideración importante, especialmente cuando se utilizan métodos de censo de población que requieren mucho tiempo y mano de obra. La rentabilidad puede aumentarse mediante una combinación adecuada de seguimiento extensivo e intensivo. El seguimiento inicial extensivo de pupas o adultos, por ejemplo, puede ir seguido de un seguimiento más intensivo de los huevos o incluso de los primeros estadios, pero dentro de una zona mucho más pequeña identificada como de mayor riesgo. En el caso de algunas plagas, pueden utilizarse trampas cebadas para los estudios iniciales extensivos con el fin de identificar las zonas más restringidas para el censo de la población. Las capturas en trampas cebadas también pueden correlacionarse con los niveles de daño de la plaga y utilizarse para establecer umbrales de brotes o de control. De hecho, la mayoría de las operaciones de control dependen de un umbral de densidad crítico establecido, que representa el punto en el que se producirán daños significativos.

A menudo hay poca información sobre la eficacia absoluta de las trampas disponibles comercialmente, pero Thomson (1991) analiza algunos de los factores que influyen en la captura de trampas. En la práctica, las trampas utilizadas en el monitoreo tienden a ser aquellas diseñadas o disponibles localmente y el costo es a menudo una consideración importante cuando se necesitan grandes cantidades. La elección de la trampa, la dosis de cebo y el nivel de mantenimiento determinarán las características operativas de la trampa (Sweeney et al., 1990). Para los estudios de detección, las trampas deben ser eficientes y estar cebadas con señuelos muy atractivos que liberen los compuestos durante un período prolongado. En este sentido, cuanto más atrayente/específica sea la trampa, se obtendrán muestras más "limpias" (que son fáciles de contar) y representativas.

Según lo expuesto hasta aquí, ha quedado demostrado que resulta fundamental conocer la biología y la ecología de las especies que pudieran resultar en un potencial (o actual) problema y así poder actuar en consecuencia. En lo que respecta al MIP, un punto elemental es el correcto monitoreo de las poblaciones de organismos que se encuentran en conflicto. Por lo tanto, si deseamos desarrollar una herramienta de captura sensible y eficiente, deberíamos comprender fundamentalmente las capacidades sensoriales de dichos organismos. A continuación, nos referiremos justamente a la ecología sensorial, con especial énfasis en los insectos.

1.4 Ecología sensorial

La ecología sensorial es el estudio de cómo los organismos utilizan la información sensorial en sus interacciones con el medio ambiente, incluidos todos sus componentes bióticos y abióticos. Como en la mayoría de las disciplinas científicas, incluye un aspecto descriptivo, cuyo objetivo es clasificar los distintos tipos de interacciones sensoriales y dilucidar los mecanismos por los que se producen. De este modo, la ecología sensorial abarca la física, la química y la fisiología que subyacen a la generación y percepción de los estímulos sensoriales (Dusenbery, 1992; Barth & Schmidt, 2001).

1.4.1 Señales sensoriales y ecología

La información sensorial constituye la base de todas las interacciones entre un organismo y su entorno. En gran medida, estas interacciones se conforman y son conformadas por los acontecimientos evolutivos. Así, la especiación puede estar impulsada por una mayor sofisticación sensorial que conduce a nichos más diversificados. Los organismos también deben especializarse para competir en un mundo diversificado, lo que en gran medida puede estar relacionado con la necesidad de un uso eficiente de la información sensorial. Los cambios de hospedador entre los insectos también están asociados a su ecología sensorial. Estos acontecimientos pueden producirse cuando los hospedadores alternativos se asemejan al hospedador original en aspectos críticos, lo que provoca "errores" que finalmente conducen a la formación de nuevas poblaciones y especies de hospedadores a través de la deriva genética o la selección divergente (Schoonhoven et al., 1998; Linn et al., 2003).

Un denominador común de los estímulos sensoriales es la transferencia de información a través de interacciones entre señales químicas o físicas y receptores especializados que transducen la información en impulsos nerviosos. Los receptores sensoriales suelen operar cerca de su máxima sensibilidad teórica, registrando la presencia de moléculas de olor o fotones individuales (Hardie, 2001; Minor & Kaissling, 2003). Sin embargo, la capacidad de un organismo para detectar y extraer información de una señal ambiental depende principalmente de otros factores además de la sensibilidad absoluta de los receptores sensoriales. Algunas adaptaciones, como las orejas grandes, las antenas o las pupilas, aumentan la sensibilidad al incrementar la captación total de la señal. Otras adaptaciones, como los ojos grandes con muchos receptores, aumentan la resolución del sistema sensorial y conducen a una representación más detallada del mundo exterior. Otra clase importante de adaptaciones aumenta la capacidad del sistema nervioso para distinguir las señales sensoriales de varios tipos de ruido interno o externo (por ejemplo, la actividad espontánea de los receptores o las neuronas y las señales de otras fuentes que interactúan con el mismo receptor) que tienden a enmascarar su presencia. Los límites de la detección los establece, en última instancia, la relación entre la señal y el ruido que puede obtener el sistema sensorial (Dusenbery, 1992; Todd & Baker, 1999; Warrant, 2001).

Los sistemas sensoriales están adaptados para extraer información significativa en contextos específicos, siendo quizás el elemento más importante, la relación entre la fuente/emisor (objetos animados o inanimados) y el receptor (Figura 3). Un objeto, el emisor, produce una señal que se transmite a través de un medio (aire, agua o sustrato) y es detectada por un individuo, el receptor. La señal puede verse afectada por diversos factores bióticos y abióticos durante su traslado a través del medio. Pueden darse dos formas de explotación del canal de comunicación. En primer lugar, el emisor puede ser explotado por enemigos capaces de detectar y localizar la fuente de la señal (ej., Robert et al., 1992). En segundo lugar, los explotadores del receptor pueden atraerlo utilizando señales similares a la "verdadera" del emisor (ej., Schiestl et al., 1999), o pueden utilizar la señal para interceptar a los receptores en su camino hacia la fuente.

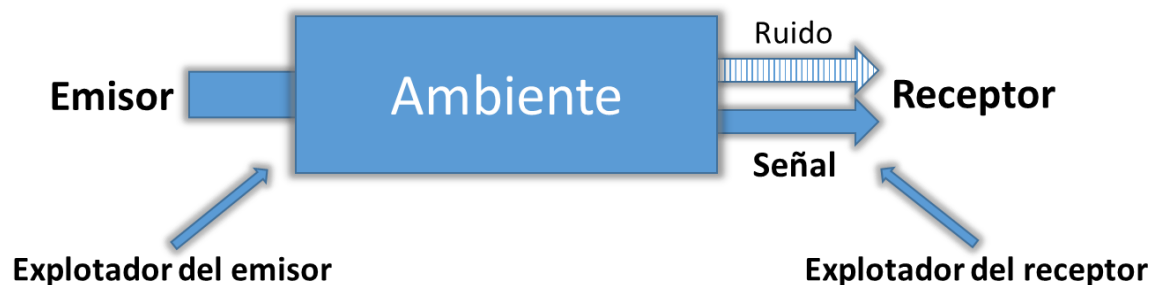


Figura 3. Componentes básicos del sistema emisor-receptor (Endler, 1993; Bradbury & Vehrencamp, 1998).

Si la interacción es beneficiosa para ambos participantes, suele producirse una verdadera comunicación, en la que el emisor y el receptor pueden “ponerse de acuerdo” sobre una señal y su significado y “esforzarse” por optimizar la transmisión de la señal excluyendo a los participantes no deseados (Wyatt, 2003). Si la interacción es perjudicial, las partes deben “intentar excluirse”; el emisor reduciendo o confundiendo la señal -una adaptación conocida como crípsis- y el receptor aumentando la capacidad de procesamiento de la señal para distinguir mejor las señales desfavorables de las adaptativas. La elección de las señales que se utilizan en un contexto concreto depende de muchos factores, como el tipo de información transmitida, el medio circundante, el tiempo y el rango en el que la señal está activa (Alcock, 1984; Endler, 1993; Bradbury & Vehrencamp, 1998). En la comunicación, los costes en términos de gasto energético y riesgo de depredación son también factores muy importantes (Phelan, 1992; Zuk & Kolluru, 1998).

La optimización de los sistemas sensoriales para lograr una alta eficiencia en la utilización de los recursos se facilita probablemente mediante la selección de una combinación de unos pocos estímulos predecibles que indiquen el recurso esencial con gran certeza (Bernays, 2001). Está claro que los insectos pueden modificar su comportamiento y hacer elecciones progresivamente más acertadas a través de la experiencia (Weiss, 1997; McNeely & Singer, 2001; Menzel & Müller, 2003), pero las preferencias innatas constituyen la base de la especialización en los insectos.

Otra parte importante de la especialización en señales puede ser la necesidad de evitar errores. Las preferencias de las hembras que oviponen son a veces mucho más estrechas que la gama de plantas en las que pueden

sobrevivir sus larvas, lo que indica que los insectos no pueden determinar la idoneidad de los posibles hospedadores *per se*, sino que utilizan señales indirectas que han demostrado ser fiables en el pasado (Schoonhoven et al., 1998). Los órdenes de insectos con un alto grado de asociación a hospedadores específicos (por ejemplo, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera) suelen tener estadios juveniles que tienen pocas oportunidades de cambiar de hospedador una vez que la hembra ha tomado la decisión de oviponer, lo que debería promover el conservadurismo en la elección de la hembra.

1.4.2 Modalidades sensoriales

A pesar de su pequeño tamaño y de su sistema nervioso relativamente sencillo, los insectos utilizan de una impresionante variedad de estímulos sensoriales para obtener información relevante del entorno. En este escrito, presentaremos y desarrollaremos 2 de las principales modalidades sensoriales: la quimiorrecepción (particularmente de moléculas en estado gaseoso) y la visión. Vale aclarar que existen otras modalidades relevantes, a saber, la mecanorrecepción/audición (Devetak, 1998; Cocroft & McNett, 2006), la termorrecepción (Clements, 1999; Angioy et al., 2004), la recepción de infrarrojos (Schütz et al., 1997), y la magnetorrecepción (Walker & Bitterman, 1985). Aunque estas últimas representan fascinantes adaptaciones sensoriales especializadas, no resultan, sin embargo, primordiales para este trabajo.

Las disciplinas que se encargan de estudiar el papel de las interacciones químicas y visuales entre los organismos y el ambiente, son la *Ecología Química* y *Ecología Visual*, respectivamente. De manera resumida, la ecología química estudia el papel de las interacciones químicas entre organismos vivos y su ambiente y las consecuencias de esas interacciones en la etología y evolución de los organismos en cuestión. Es un campo de estudios altamente interdisciplinario. Mientras que la ecología visual, desde su sentido más básico y práctico, puede ser definida como la relación de los individuos con el ambiente que los rodea a través del sistema visual, con el fin de satisfacer las necesidades alimenticias, reproductivas y de supervivencia. Estas serán más desarrolladas a lo largo de este trabajo en los próximos capítulos. Lo relevante de estas áreas es que pueden avanzar dentro de un equilibrio “ideal” entre ciencia básica – generando información sobre los complejos y

sofisticados mecanismos de relación química y visual entre los organismos (y el ambiente) – y la ciencia aplicada – buscando nuevos caminos que permitan un manejo de los recursos bióticos más adecuado y menos dañino para el ambiente.

1.5 Modelo de estudio: *Sirex noctilio*

Sirex noctilio Fabricius (Hymenoptera; Symphyta; Siricidae), la avispa barrenadora de la madera, es un himenóptero endémico de Europa, Asia y el norte de África. Los adultos se caracterizan por su forma, tamaño y su dimorfismo sexual característico (Figura 4). Las avispas de la familia Siricidae, pueden desarrollarse sobre una amplia gama de hospedadores, pero particularmente *S. noctilio* muestra una marcada preferencia por los pinos y es el único sirícido que tiene el potencial de matar árboles vivos (Morgan & Stewart, 1966; Spradbery, 1973; Spradbery & Kirk, 1978). En este sentido, los árboles fisiológicamente estresados son más atractivos y susceptibles de ser atacados por las hembras (Madden, 1968). El impacto de *S. noctilio* es importante y se produce por la rápida muerte del árbol atacado, pero, además, por el detrimento en la calidad de su madera.



Figura 4. Fotografías de un macho (izquierda) y una hembra (derecha) adultos de *S. noctilio*. Crédito de la imagen: Masagué S.

En su área de origen, se considera una plaga secundaria de varias especies de pinos (Spradbery & Kirk, 1978) y es de poca importancia económica y ecológica. Sin embargo, durante el siglo XX, *S. noctilio* demostró un gran potencial invasor y se estableció en varios países del hemisferio sur (Ciesla, 2003). En regiones de esta área de distribución introducida, la avispa se ha convertido en una plaga primaria de algunas especies de pino, sobre todo

cuando sus densidades poblacionales son elevadas (Rawlings, 1948; Hurley et al., 2007)(Figura 5). En algunas situaciones ha causado una amplia mortalidad en estas plantaciones de pinos introducidos, especialmente en las afectadas por estrés, como la sequía (Neumann & Minko, 1981). Más recientemente se ha introducido en Norteamérica (Hoebeke et al., 2005; de Groot et al., 2006) y China (Li et al., 2015), suscitando un gran interés y preocupación en estas regiones.



Figura 5. Estallido poblacional de *S. noctilio* en el valle de Meliquina (Pcia. del Neuquén) en una plantación de *P. contorta* con la característica clorosis foliar luego del ataque de la avispa invasora. Crédito de la imagen: Villacide J.

La avispa de la madera tiene un estilo de vida críptico ya que la mayor parte de su ciclo vital transcurre como larva dentro de la madera de su hospedador, lo que dificulta su detección. El desarrollo de *S. noctilio*, y por tanto su potencial reproductivo, está ligado fuertemente al de su simbionte fúngico, el basidiomicete *Amylostereum areolatum* (Fries) Boidin (Coutts & Dolezal, 1965). La simbiosis con esta especie es obligatoria y específica de *S. noctilio*, siendo el único miembro de la familia Siricidae que constituye una relación con *A. areolatum* (Talbot, 1977). Sin embargo, estudios más recientes indican que otros sirícidos nativos de Norteamérica, donde *S. noctilio* ha llegado recientemente, también son portadores de *A. areolatum*, mostrando cierta flexibilidad en las asociaciones sirícido-simbionte (Olatinwo et al., 2013; Hajek, Harris, et al., 2018; Hajek, Tobin, et al., 2018). Las hembras adultas transportan el hongo dentro de micangias que se encuentran en el extremo anterior del ovipositor y se abren en el oviducto (Boros, 1968). De esta manera, el hongo se beneficia considerablemente de

su relación con la avispa de la madera. Se protege en la micangia de la avispa y a su vez el insecto dispersa al hongo, llevándolo directamente a un sustrato adecuado y relativamente libre de competencia. Las interacciones entre las dos biotas y una fitotoxina producida por la avispa permiten debilitar las defensas de sus árboles hospedadores vivos.

1.5.1 Ciclo de vida

Sirex noctilio se desarrolla entre 1 y 3 años, pero en la mayoría de las regiones la mayor parte de las emergencias se producen dentro del año (Morgan, 1968). Como todos los himenópteros, estos insectos tienen un sistema haplodiploide de determinación del sexo. Si las hembras han sido fecundadas podrán desarrollarse hembras o machos, si no, sólo se desarrollarán machos. Los adultos emergen desde principios o mediados del verano hasta principios del otoño y la emergencia es protándrica; los machos emergen unos días antes que las hembras (Figura 6) (Rawlings, 1948; Morgan & Stewart, 1966).



Figura 6. El ciclo de vida de *Sirex noctilio* en el que su hongo mutualista, *Amylostereum areolatum*, tiene un papel fundamental en la dieta adaptación de Slippers et al., 2011.

Ambos sexos son sexualmente maduros al emerger de los troncos (Neumann et al. 1987). Las hembras descansan en el tronco antes de desplazarse a la copa del árbol, donde los machos se agrupan y se reúnen con las hembras para el apareamiento (Morgan & Stewart, 1966; Madden, 1988).

Tras el apareamiento, o en ausencia del mismo, las hembras localizan un árbol para la oviposición (Figura 7). Una vez localizado un potencial hospedador, la hembra explora el tronco con sus antenas en la superficie de la corteza y luego sondeando la madera con su ovipositor (Francke-Grosman, 1939; Madden, 1988). La selección de árboles

hospederos, por lo tanto, implica en primera instancia (a) la atracción de las avispas hembras a un lugar potencial para la oviposición y (b) la posterior evaluación del lugar como sustrato de oviposición (Madden, 1974).

Cuando encuentra un árbol adecuado, la hembra suele empezar a poner huevos cerca de la base del árbol y va subiendo, perforando cámaras de oviposición simples, dobles, triples o cuádruples (Rawlings, 1948; Morgan & Stewart, 1966). Varias hembras pueden atacar un solo árbol (Bedding, 1972). Las avispas hembras rara vez se alejan del árbol en el que están oviponiendo (Morgan & Stewart, 1966), lo que tal vez contribuya al patrón de agrupación de árboles atacados que suele ser evidente dentro de un rodal (Corley et al., 2007). La tasa de oviposición está influenciada por las condiciones ambientales, siendo la temperatura y la humedad relativa factores determinantes (Morgan & Stewart, 1966; Madden, 1974).



Figura 7. Hembra de *S. noctilio* en el proceso de oviposición. Se observa el órgano ovipositor siendo insertado en la madera de pino. Crédito de la imagen: Masagué. S.

Dependiendo de la calidad del sitio, la hembra generalmente pone hasta tres huevos por sitio de perforación, cada uno en túneles separados (Madden, 1974, 1988). Un último túnel sin huevos, en cada sitio de perforación, es inoculado (a través del órgano ovipositor) con artrosporas o fragmentos de *A. areolatum*, así como con el mucus (Coutts & Dolezal, 1969). Se cree que el moco es un complejo de proteínas y polisacáridos. Se sabe que contiene

varias enzimas, entre ellas amilasa, esterasa, fenoloxidasa y enzimas proteolíticas (L. K. Wong & Crowden, 1976). El moco se sintetiza en un par de glándulas secretoras y se almacena en un reservorio hasta su uso; un conducto conecta dicho reservorio con la base del oviducto de la avispa (Boros 1968).

También se sabe que *S. noctilio* hace perforaciones individuales, introduciendo sólo el mucus y el hongo, tal vez al probar la idoneidad del árbol para la oviposición (Coutts & Dolezal, 1969; Spradbery, 1977). Estas perforaciones de prueba podrían condicionar al árbol y hacerlo propenso a nuevos ataques (Madden & Irvine, 1971).

La eclosión de los huevos está precedida por el crecimiento del simbionte fúngico alrededor del huevo (Madden, 1981). La eclosión suele producirse en 16-28 días (Morgan & Stewart, 1966) dependiendo de las condiciones de temperatura, pero puede retrasarse hasta 12 meses (Waterhouse & Sands, 2001), si las condiciones de alta humedad o las bajas temperaturas como las que se dan en la base de los árboles, impiden el crecimiento del hongo (Madden, 1981). Las larvas comienzan a hacer túneles más profundos en la madera después del tercer o cuarto estadio (Taylor et al., 1981). Perforan en la madera del árbol, excavando túneles de hasta 26 cm de longitud (Neumann et al., 1987)(Figura 8).

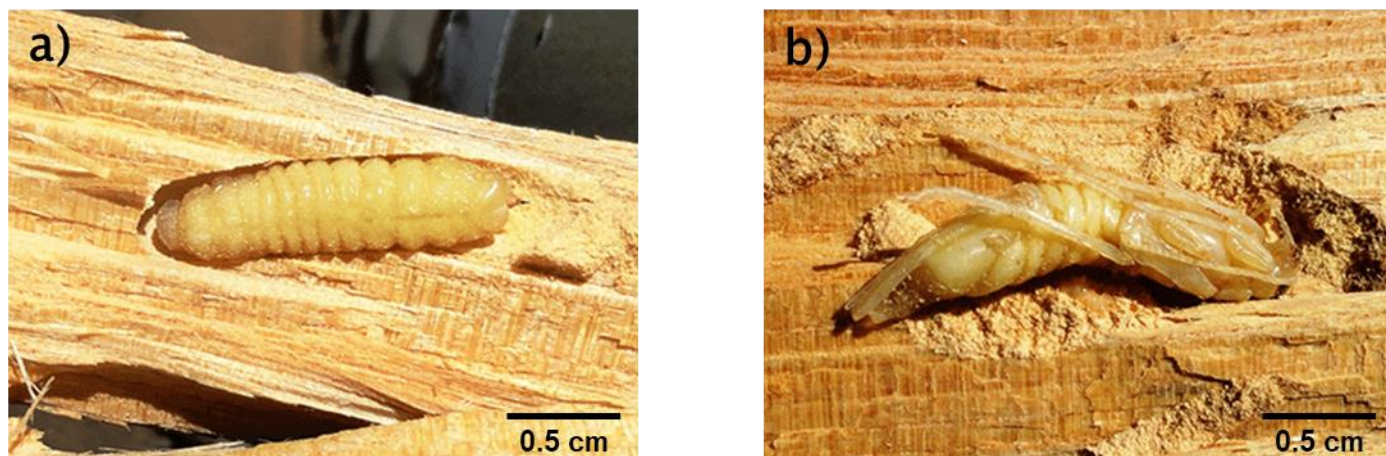


Figura 8. Larva (a) y pupa (b) de *S. noctilio* dentro de la madera del hospedador. Crédito de la imagen: SAG Chile.

Puede haber entre 6 y 12 estadios larvarios, dependiendo de las condiciones de aireación y humedad de la albura. Una vez completado el desarrollo larvario, la larva hace un túnel hacia el exterior y se convierte en prepupa a menos de 5 cm de la superficie de la corteza (Taylor et al., 1981). El periodo prepupal dura hasta 4 semanas,

mientras que la fase de pupa dura aproximadamente 20-28 días (Morgan & Stewart, 1966). En condiciones más frías y húmedas, la pupación puede no ocurrir hasta el segundo o tercer año después de la eclosión (Taylor et al., 1981).

Se estima que la dispersión natural de la avispa de los bosques es de hasta 30-50 km/año (Haugen et al., 1990). Trabajos más recientes utilizando molinos de vuelo, han mostrado que las avispas hembras vuelan entre 1 y 49 km (media 17 km) en un periodo de 20 h (Bruzzone et al., 2009). La propagación natural de la avispa de la madera se ve fácilmente incrementada por el movimiento de madera infestada, ya que todos los estadios de vida inmaduros pueden ser transportados en troncos sin procesar, madera aserrada y materiales de embalaje de madera maciza.

1.5.2 *Sirex noctilio* y su hongo simbionte

A partir del segundo estadio larvario, el hongo se transfiere de un estadio al siguiente y el adulto lo recoge en la micangia cuando se desprende de la piel de la pupa, asegurando así la asociación continúa con el hongo (Parkin, 1941; Boros, 1968). Se cree que el hongo está ausente en la fase de pupa, pero que la avispa adulta lo recoge de la pared de la cámara pupal (Francke-Grosman, 1939; Parkin, 1942).

En conjunto, el hongo y el mucus causan un severo estrés fisiológico al árbol, que incluye la alteración de las relaciones hídricas y la translocación, lo que suele ir seguido de la muerte del árbol (Coutts, 1969a, 1969b; Fong & Crowden, 1973). Los signos de toxicidad para el árbol incluyen clorosis foliar, a menudo en 2 semanas, o senescencia con o sin clorosis (Coutts, 1969b). También se ha descrito el marchitamiento de las acículas (por ejemplo, Neumann et al., (1987).

El papel del hongo en la nutrición de las avispas de la madera no está del todo claro. Kukor & Martin (1983) demuestran el papel de las celulasas derivadas de los hongos en la digestión del xilema para una especie congénera de avispas de la madera. Otros autores informan del consumo directo de madera impregnada de micelio en *S. noctilio* (Büchner, 1965). Las hifas fúngicas son digeridas por las secreciones intestinales de las larvas (Francke-Grosman, 1939) y en condiciones de laboratorio las larvas de sirícidos pueden alimentarse de hongos

puros (Cartwright, 1929). El papel del simbiote fúngico en la nutrición de las avispas de la madera puede depender de la fase de vida del insecto. Madden & Coutts (1979), sugieren que las larvas de primer y segundo estadio se alimentan exclusivamente del hongo, mientras que los estadios larvarios posteriores se alimentan de madera colonizada por el hongo. En estudios más actuales, Thompson et al., (2014) analizaron el comportamiento y la morfología funcional de las larvas. Los resultados de estos estudios indican que *S. noctilio* no ingiere xilema, sino que usa el hongo como un intestino externo para la digestión de compuestos lignocelulósicos. Independientemente del papel específico del hongo en la nutrición de las larvas, es esencial para las larvas en desarrollo. Se cree que la avispa de la madera adulta no se alimenta y sobrevive de las reservas de grasa del cuerpo (Morgan & Stewart, 1966; Taylor et al., 1981).

La presencia de *A. areolatum* es esencial a lo largo del desarrollo de la avispa de la madera. La eclosión de los huevos se retrasa cuando las condiciones del árbol impiden el crecimiento del hongo (Madden, 1981) y las larvas pueden morir de hambre si el crecimiento del simbiote es inhibido por la presencia de otros hongos (Coutts & Dolezal, 1965; King, 1966). El desarrollo de las larvas está relacionado con el crecimiento del hongo y cuando las condiciones son óptimas para el hongo, se producen adultos más grandes (Madden, 1981). El hongo también modifica el sustrato, proporcionando un microambiente más adecuado para el desarrollo de los huevos y las larvas (Coutts & Dolezal, 1965) y la degradación de la madera por el hongo facilita la “tunelización” de las larvas (Gilmour, 1965).

1.5.3 Los hospedadores de *Sirex noctilio*

Los hospedadores registrados del complejo *S. noctilio* - *A. areolatum* incluyen especies de *Pinus*, *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pseudotsuga* y *Auricularia* (Spradbery & Kirk, 1978; Madden, 1988). De éstas, las especies de *Pinus* son las preferidas (Spradbery & Kirk, 1978, 1981). Para las plantaciones de pinos en Sudamérica, la avispa de la madera *Sirex noctilio* es probablemente el problema de plagas más importante. Esta avispa solitaria que perfora la madera fue registrada por primera vez en la región a principios de los años ochenta (Iede et al., 1998) y desde entonces ha

invadido todas las zonas donde se cultivan pinos. Las poblaciones de *S. noctilio* están establecidas en un amplio rango ecológico desde el sur de Brasil y el norte de Argentina hasta el suroeste de Argentina y Chile.

En nuestro país, la actividad forestal se promueve sobre la base de la existencia de superficies extensas, con gran aptitud forestal, donde las especies exóticas alcanzan crecimientos que superan en muchos casos a los de sus zonas de origen, con lo cual se pretende diversificar la producción de la región, cubrir la demanda de madera a nivel regional y disminuir la presión de extracción sobre el bosque nativo (Davel, 2008). Como consecuencia de las políticas de promoción, considerables superficies de bosques y de otras comunidades nativas han sido sustituidas por especies exóticas. En la Patagonia, las políticas forestales privadas y estatales se orientaron durante las últimas décadas hacia la implantación de coníferas exóticas. Las especies de coníferas más utilizadas en las forestaciones en Patagonia son *Pinus contorta* (Douglas ex Loudon), *Pinus ponderosa* (Douglas ex C. Lawson) y el pino oregón (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco). En el noroeste de la Patagonia de la Argentina, existen alrededor de 70.000 ha forestadas principalmente con *P. contorta* y *P. ponderosa* (SAGPyA, 2001). Siendo la primera la que se observa más afectada, incluso en plantaciones mixtas o contiguas con *P. ponderosa*. Estas especies presentan un conjunto de atributos comunes, aunque también presentan divergencias asociadas a la altura máxima de los árboles adultos, la longevidad, el espesor de la corteza y el tamaño/peso de las semillas (mayores en *P. ponderosa*) y la precocidad y la frecuencia de producción de propágulos (mayores en *P. contorta*) (Keeley & Zedler, 1998).

1.5.4 Dinámica poblacional de *Sirex noctilio*

La dinámica de las poblaciones de *S. noctilio* se encuentran entre los aspectos menos conocidos (Madden, 1988; Corley et al., 2007). Sin embargo, se sabe que una característica de la especie es la aparición de brotes poblacionales eruptivos en forma de pulso. Los brotes tipo pulso se describen por un aumento rápido e imprevisible de las densidades y suelen terminar por enemigos naturales o por el agotamiento de los recursos (Berryman, 1987).

Los estudios a largo plazo realizados desde la introducción accidental de *S. noctilio* en Australia y Nueva Zelanda, han permitido constatar que las poblaciones de avispas de la madera pueden permanecer en niveles relativamente bajos (es decir, matando 5-10 árboles/ha/año) durante muchas temporadas, donde los ataques se centran en los árboles estresados. Sin embargo, cuando se producen brotes, éstos pueden durar entre 4 y 10 años (Madden, 1988). Es durante los brotes cuando la avispa de la madera puede causar una gran mortalidad de árboles y graves daños económicos, ya que es entonces cuando aumenta el ataque a árboles sanos (Morgan, 1968; Berryman, 1987; Madden, 1988).

En un intento de comprender los brotes observados de *S. noctilio*, Madden (1988) basándose en datos de campo y experimentales, propuso la "hipótesis de la sequía intermitente". Según esta hipótesis, los niveles discontinuos de sequía que se producen durante la temporada de aparición de la avispa de la madera aumentan el atractivo de los árboles y la susceptibilidad a los ataques de *S. noctilio*. Por su parte, Corley et al. (2007) propusieron que la fuerte agregación espacial, como consecuencia de la limitada redistribución espacial de las avispas hembras, podría conducir a un mayor rendimiento del insecto a través de la concentración de los ataques en los árboles. Sin embargo, los mecanismos ecológicos que subyacen a los brotes de las poblaciones invasoras de *S. noctilio* siguen siendo una importante cuestión abierta. Dado que *S. noctilio* es probablemente la plaga más dañina de los pinos cultivados en varios países del mundo (Ciesla, 2003), el conocimiento de la dinámica poblacional es una parte importante de la modelización de la propagación (y el crecimiento de la población), y es esencial para el éxito de la gestión y el control de la población.

1.5.5 Manejo de *Sirex noctilio*

El manejo de las plantaciones puede influir en gran medida en la susceptibilidad de los árboles al ataque de *S. noctilio*. Madden (1988), considera que la mala silvicultura era una de las razones principales de los brotes en Australia y Nueva Zelanda. De forma similar Neumann et al. (1987), afirma que los brotes eran en gran medida un problema de gestión y que podían evitarse mediante la vigilancia rutinaria de las plantaciones y la aplicación de medidas silvícolas. La densidad del rodal es uno de los principales factores que pueden influir en el estrés de los

árboles. Los rodales de alta densidad tienen una mayor proporción de árboles suprimidos que son más susceptibles al ataque. Estos árboles susceptibles permiten que *S. noctilio* se establezca y ataque árboles más sanos en las siguientes temporadas a medida que las poblaciones crecen. El momento de las operaciones silvícolas, como la poda y el raleo también pueden influir en la susceptibilidad de los árboles al ataque de *S. noctilio*. Los daños mecánicos en los árboles durante estas operaciones pueden hacer que esos árboles sean más susceptibles de ser atacados, por lo que se sugiere que estas operaciones no se realicen durante o justo antes de la temporada de vuelo de *S. noctilio* (Neumann et al., 1987). Finalmente, es de suma importancia tener en cuenta que, la ausencia de enemigos naturales en el área de distribución introducida de *S. noctilio*, fue una de las razones de las altas infestaciones que se han producido fuera de su área de origen. Allí, donde los enemigos naturales (nematodos, avispas parasitoides, etc.) están presentes, *S. noctilio* no causa grandes daños (Spradbery & Kirk, 1978). Algunos de estos organismos se han utilizado como agentes de control biológico en el hemisferio sur, con diversos niveles de éxito (Hurley et al., 2007).

1.5.6 Monitoreo de *Sirex noctilio*

En las regiones en las que *S. noctilio* afecta negativamente a los sistemas productivos, la vigilancia y el seguimiento de las poblaciones de avispas se ha llevado a cabo normalmente mediante la instalación de árboles trampa, además del reconocimiento visual de los árboles afectados a través de estudios terrestres o aéreos. Estos métodos tienen una serie de limitaciones que es importante considerar (Martínez et al., 2014; Corley et al., 2019). Por un lado, la instalación de árboles trampa implica elevados costos, logística y el manejo de sustancias tóxicas (herbicidas) por parte de los operarios con sus consecuentes impactos en la salud y el medio ambiente (Zylstra et al., 2010). Por otro lado, y teniendo en cuenta el carácter invasivo de la especie, esta metodología no permite el seguimiento en zonas libres de pinos que tienen un alto riesgo de entrada (por ejemplo, puertos y fronteras), y es ineficaz cuando las poblaciones son incipientes (por ejemplo, en zonas de reciente establecimiento o de avance). Los signos de árboles infestados por *S. noctilio* utilizados para la inspección visual son sutiles (Hoebeke et al., 2005; Ayres et al., 2009) y actualmente no se dispone de trampas específicas. Algunas trampas utilizadas

para detectar *S. noctilio* se han basado en trampas diseñadas para capturar otras plagas forestales (trampas de intercepción y trampas de embudo) cebadas con atrayentes generales de kairomonas (Bashford, 2008; Dodds & De Groot, 2012; Hurley et al., 2015). En este sentido, Allison & Redak (2017), realizaron un meta-análisis mediante el cual se observó un efecto diferencial entre el uso de trampas de embudo múltiple y de panel para censar coleópteros forestales voladores y sus asociados (Siricidae). En general, las trampas de panel de intercepción capturaron más individuos que las trampas de embudo múltiple, independientemente del gremio o familia examinados. En cuanto a los cebos químicos, un ejemplo de una solución utilizada frecuentemente en trampas de monitoreo de *S. noctilio* es la trementina. Esta solución es utilizada frecuentemente como cebo para las trampas de monitoreo de *S. noctilio*. Se trata de un líquido volátil e incoloro producido mediante la destilación de la resina, o miera, de diversas especies coníferas. Está formado principalmente por una mezcla de hidrocarburos terpénicos, mayormente alfa y beta pinenos (ACM Resinas; Vilman T. & Balzaretti V.E., 1994, Masague obs. pers.). Según lo expuesto hasta aquí, resulta fundamental aumentar el conocimiento acerca de la ecología de *S. noctilio*, para poder mejorar las técnicas de monitoreo que permitan una detección más eficaz y específica de la especie invasora (Rodríguez-Saona & Stelinski, 2009).

1.5.7 Ecología sensorial de *Sirex noctilio*

1.5.7.1 Ecología química

Si nos referimos a los compuestos orgánicos volátiles (COVs) que podrían resultar relevantes para la avispa invasora *S. noctilio*, los semioquímicos podrían provenir de la planta hospedadora (i.e. pino), de conoespecíficos y/o de otros organismos asociados (i.e.: hongo simbiote). Los COVs son un conjunto de hidrocarburos que en circunstancias normales se encuentran en forma gaseosa a temperatura ambiente, o bien, tienen una alta volatilidad en esas condiciones. Muchos de los estudios sobre la ecología química de la avispa de la madera se han centrado en los volátiles producidos por el pino hospedador. En este sentido, existe un acuerdo en que las

hembras se ven particularmente atraídas por los árboles estresados y utilizan COVs para encontrarlos (Madden, 1968, 1971; Madden & Irvine, 1971; Simpson, 1976; Simpson & McQuilkin, 1976; Böröczky et al., 2012).

Estudios más recientes han explorado otros tipos de fuentes de estímulo. Por ejemplo, Cooperband et al. (2012) identificaron un volátil de proximidad producido por los machos que es activo tanto en las hembras como en los machos en los ensayos de laboratorio, pero no en el campo, y todavía no ha sido posible encontrar una respuesta de atracción lo suficientemente fuerte como para ser utilizada en los métodos de seguimiento específicos de la especie (Hurley et al., 2015).

Se ha sugerido que el éxito de la búsqueda de hospedadores por parte de *S. noctilio* puede depender tanto de COVs de la planta hospedadora como del simbionte *A. areolatum* (Bashford, 2008; Costello et al., 2008; Erbilgin et al., 2017). Las hembras de *S. noctilio* podrían utilizar los volátiles del hongo para detectar árboles previamente atacados (probablemente bajo condiciones de estrés), agregando así el ataque de más de una hembra en un árbol, aumentando por tanto las probabilidades de debilitar las defensas del árbol. Esto es consistente con los patrones de ataque de las avispas observados en el campo y con investigaciones previas que muestran que estos pueden ser altamente agregados a escala de rodal (Corley et al., 2007; Villacide & Corley, 2012). En relación con esto, investigaciones anteriores han mostrado una atracción relativamente fuerte de las hembras de *S. noctilio* hacia el hongo *A. areolatum* cultivado en medio de cultivo artificial, en pruebas de olfatometría (Fernández Ajó et al., 2015). En este sentido, algunos estudios han identificado los principales componentes de los COVs de *A. areolatum* (Jofré et al., 2016; Sarvary et al., 2016a; Wang et al., 2019). A pesar de estos estudios, falta información detallada sobre cómo los volátiles emitidos por el simbionte que crece en la madera podrían regular el comportamiento de las avispas hembras.

1.5.7.2 Ecología visual y multimodal

La mayor parte de los estudios acerca de la ecología sensorial de *S. noctilio*, se han realizado en torno a la ecología química, mientras que existen escasos trabajos en cuanto a la ecología visual de esta especie. Nos referiremos a algunos de ellos de manera resumida, a modo de introducción, para luego desarrollar dichos estudios en el

correspondiente capítulo. En el 2014, Sarvary et al. , evaluaron el desempeño de trampas transparentes frente a trampas negras (sin cebos), y estas últimas resultaron en un mayor porcentaje (muy bajo) de capturas de hembras en ensayos en túnel de vuelo. A continuación, los autores han demostrado que la adición de luz U.V. podría aumentar la eficacia de las trampas. Por su parte, Hurley et al. (2015), demostraron en un estudio de campo que con ambos tipos de trampas (negras y transparentes) sin cebo químico, se obtenían un número de capturas similares (y muy bajo). Sin embargo, las trampas oscuras con cebo químico aumentaban las capturas mientras que con las trampas claras esto no sucedía.

En el 2019, Allison et al., realizaron ensayos de campo con trampas, para examinar el impacto de los estímulos (principalmente visuales) asociados a los machos de *S. noctilio* en la captura de hembras coetáneas (en base al dimorfismo sexual observado en esta especie). Sin embargo, los resultados obtenidos demostraron que este tipo de señal no resultaría efectiva.

Finalmente, los pocos estudios que existen acerca de las capacidades visuales de especies cercanas a *Sirex noctilio*, se han realizado en fotorreceptores de *Urocerus gigas* (Hymenoptera: Siricidae) y *Xiphydria camelus* (Siricoidea Hymenoptera: Xyphidriidae), la misma a la que pertenecen los Sirícidos. (Briscoe & Chittka, 2003). En este sentido, en el 2021, Guignard et al. realizaron un estudio con el fin de identificar los tipos de fotorreceptores del ojo compuesto, caracterizar los genes de opsina visual de *S. noctilio* y analizar la expresión de ARNm de opsina. Más allá de estos estudios realizados, no se ha encontrado hasta ahora una clave visual que permita (junto a un atrayente químico), maximizar la atracción de las hembras de *S. noctilio*.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Identificar atrayentes químicos y visuales especie-específicos de la avispa barrenadora de los pinos *S. noctilio* con el fin de incorporar dicha información a protocolos de monitoreo y manejo ambientalmente sustentable de la plaga.

1.6.2 Objetivos específicos

1. Identificar *claves químicas* que permitan maximizar la atracción de hembras de la avispa *S. noctilio*.
 - a. Establecer el comportamiento olfativo de hembras de *S. noctilio* hacia el hongo simbiote en diferentes medios de crecimiento (**Capítulo 2**).
 - b. Establecer la respuesta antenal (electrofisiología de hembras de *S. noctilio*) hacia compuestos específicos emitidos por las fuentes probadas en 1.a y establecer tentativamente la identidad de los mismos (**Capítulo 3**).
2. Identificar las *claves visuales* que permitan maximizar la atracción de hembras de la avispa *S. noctilio*.
 - a. Analizar las coloraciones (i.e. reflectancias) de posibles fuentes de información visual relevantes en la ecología de las hembras de *S. noctilio* (**Capítulo 4**).
 - b. Establecer la respuesta a campo de hembras de *S. noctilio* hacia trampas con las diferentes coloraciones obtenidas en 2.a (**Capítulo 4**).
3. Estudiar el comportamiento de hembras de *S. noctilio* frente a la combinación de claves químicas y visuales específicas identificadas en los capítulos 2, 3 y 4 (**Capítulo 5**).

1.7 Hipótesis y predicciones

1.7.1 Hipótesis y predicción general

La información química suele ser la más utilizada en insectos que utilizan este tipo de claves con el fin de satisfacer las necesidades alimentarias, reproductivas y de supervivencia. Por otro lado, la información visual suele ser un complemento importante. Desde un punto de vista práctico, ambos tipos de señales podrían maximizar las capturas de una especie en particular y por lo tanto la eficiencia del sistema de captura. A partir de estas premisas, se planteó la siguiente hipótesis y predicción general:

Hipótesis (H): En el proceso de búsqueda de sitios para la oviposición y/o cópula, existen claves químicas y visuales que serán determinantes para la atracción de las hembras de *S. noctilio*.

Predicción (P): Las hembras de *S. noctilio* mostrarán una atracción maximizada hacia compuestos químicos volátiles emitidos por el hongo simbiote *A. areolatum* en madera de hospedadores (*P. contorta* y *P. ponderosa*) y señales visuales ecológicamente relevantes (color de la corteza del pino, acículas cloróticas y abdomen de machos).

1.7.2 Hipótesis y predicciones particulares

La avispa *S. noctilio* evolucionó en entornos donde los pinos susceptibles son nativos y se encuentran en bosques mixtos, junto con otras especies leñosas. En las zonas en las que se ha introducido, *S. noctilio* suele encontrarse en bosques de pinos comerciales sanos de pocas especies, donde el entorno tiende a ser más homogéneo. En cualquiera de estos escenarios, encontrar un huésped adecuado puede ser un proceso complejo. La detección de un árbol previamente atacado, seguida de una oviposición (y por lo tanto una agregación a nivel árbol), puede resultar ventajosa para el desarrollo de las larvas, tanto a nivel nutricional como por las posibilidades de superar las defensas del árbol por la inoculación del hongo y el veneno fitotóxico. En este contexto, se planteó las siguientes hipótesis y predicciones:

H1: Las hembras de *S. noctilio* utilizan volátiles fúngicos y del pino para detectar árboles previamente atacados.

P1.1: Las hembras adultas de *S. noctilio* mostrarán una preferencia comportamental hacia el hongo simbiote con crecimiento en condiciones naturales (madera de *P. contorta* y *P. ponderosa*), frente al hongo que crece en medios artificiales o la madera sin hongo. **(Capítulo 2).**

P1.2: Las hembras de *S. noctilio* mostrarán respuestas antenales a determinadas combinaciones de compuestos volátiles, según provengan de: el hongo simbiote creciendo en medio artificial, en madera del hospedador (*P. contorta* y *P. ponderosa*) o la madera sola. Dichas respuestas permitirán el discernimiento de las fuentes. **(Capítulo 3).**

Como se mencionó anteriormente, la información visual suele ser un complemento importante para los insectos en el proceso de satisfacer las necesidades alimentarias, reproductivas y de supervivencia. En este sentido, en cuanto a la búsqueda o elección de hospedadores, hemos visto que las avispas de *S. noctilio* tienen una evidente preferencia por cierto género particular de plantas (*Pinus*) e incluso podrían presentar preferencias entre distintas especies de este género. Más aún, los árboles estresados (que presentan una sintomatología particular a nivel visual, ej.: clorosis foliar), pueden atraer aún más a las hembras de estos insectos. Finalmente, en cuánto al proceso de búsqueda de conespecíficos para la cópula, sabemos que existe un dimorfismo sexual marcado en esta especie, siendo que los machos de las avispas presentan una coloración particular distinta a la de las hembras. En este contexto, se planteó la siguiente hipótesis y predicción:

H2: Existen claves visuales (color de la corteza del pino, acículas cloróticas y abdomen de machos), capaces de maximizar la respuesta de atracción por parte de las hembras de *S. noctilio*.

P2.1: Las hembras de *S. noctilio* serán más atraídas hacia trampas con la coloración particular de (i) la corteza del pino, (ii) acículas cloróticas y (iii) el abdomen de machos, que hacia trampas negras. **(Capítulo 4).**

Teniendo en cuenta las hipótesis planteadas hasta aquí y los objetivos generales de este trabajo, se propuso la siguiente hipótesis particular y predicciones con el objetivo de integrar los resultados de los capítulos anteriores:

H3: Existe algún compuesto emitido por el hongo simbiote capaz de atraer a las hembras de *S. noctilio*, y en conjunto con volátiles del hospedador (y claves visuales particulares) esta atracción se verá potenciada.

P3.1: Las hembras de *S. noctilio* se verán atraídas hacia el anisaldehído (vs. Aire) y mostrarán una preferencia hacia dicho compuesto frente a otras fuentes de estímulos relevantes (i.e. hongo en medio artificial, cebo comercial y hongo en madera). **(Capítulo 5)**.

P3.2: Trampas con una coloración particular (colores de la corteza del pino), en combinación con volátiles de hospedador (cebo comercial, i.e. trementina) y volátiles provenientes del hongo (anisaldehído), maximizarán el número de capturas de hembras de *S. noctilio*. **(Capítulo 5)**.

1.8 Resumen del proyecto

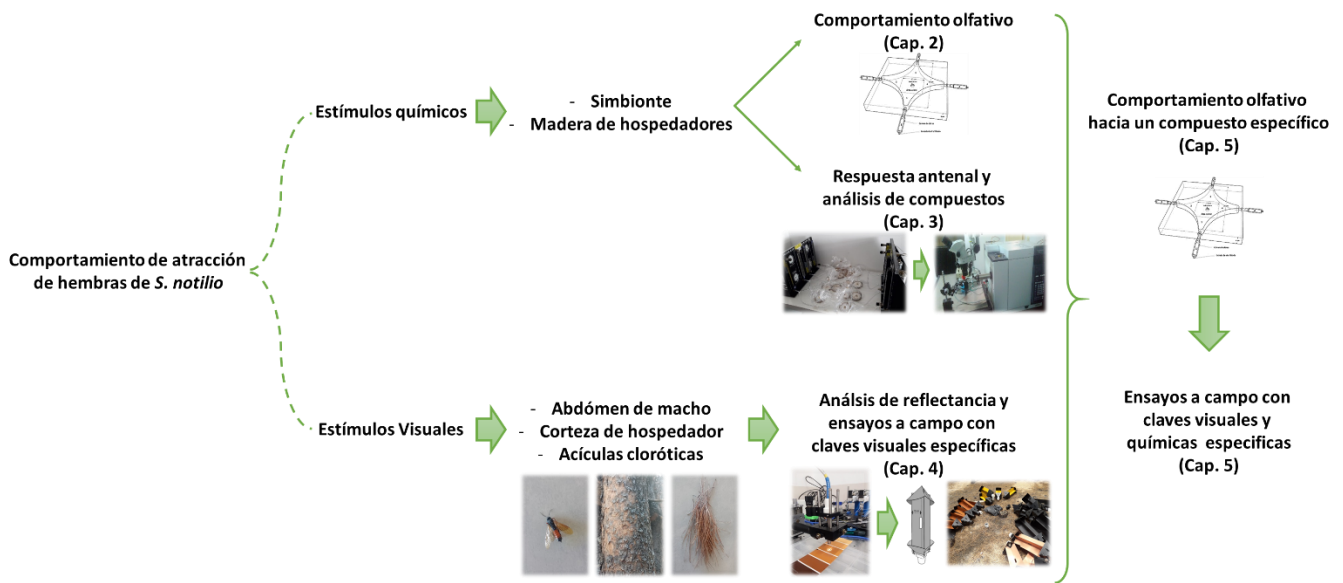


Figura 9. Resumen del proyecto de tesis.

Capítulo 2. Comportamiento olfativo de *Sirex noctilio* frente al hongo simbiote *Amylostereum areolatum* en distintos medios de crecimiento

2.1 Introducción

2.1.1 Ecología química

Las señales químicas son probablemente las más importantes para que los insectos determinen la idoneidad de los lugares de alimentación y oviposición. Por lo general, se supone que la búsqueda de recursos adecuados implica la interacción entre señales positivas (atrayentes y estimulantes) y señales negativas específicas (repelentes e inhibidoras) que alejan al animal de las elecciones inadecuadas (Schoonhoven et al., 1998; Schlyter & Birgersson, 1999). En los hábitats terrestres, la quimiorrecepción puede dividirse en: quimiorrecepción de moléculas en estado gaseoso y quimiorrecepción de compuestos en estado líquido o sólido. En este trabajo, nos referiremos a los mismos como sistemas olfativo y gustativo. Aquí nos concentramos particularmente en la olfacción y en cómo los insectos utilizan los olores para navegar por sus variados entornos.

La quimiorrecepción presenta problemas específicos que suponen un reto tanto para los investigadores como para los organismos estudiados. Cada tipo de molécula de olor es única, en el sentido de que no puede describirse en relación con otras moléculas en una sola dimensión a lo largo del espectro como la distribución de las longitudes de onda en el caso de la luz o el sonido. Es por ello que el número de posibles odorantes u otros estímulos químicos que pueden encontrar los organismos es enorme y, a efectos prácticos, infinito. Estos factores dificultan la clasificación del universo de los olores según parámetros físicos o químicos y la adecuación de los ligandos químicos a los receptores sensoriales. Sin embargo, como veremos, los estímulos químicos definidos que comprenden compuestos individuales (o más a menudo mezclas de varios compuestos) transmiten información específica sobre las fuentes de olor. Estos estímulos suelen clasificarse colectivamente como semioquímicos o infoquímicos. Desde una perspectiva ecológica, tiene sentido agrupar los estímulos químicos según su papel en la interacción entre emisor y receptor, así como por el tipo de información que transmiten.

2.1.2 Clasificación de los semioquímicos

Excluyendo las hormonas, que transmiten señales *dentro* de un individuo, otros semioquímicos transmiten información *entre* individuos. Éstos se dividen principalmente en feromonas, que transmiten señales entre conespecíficos, y aleloquímicos, que transmiten señales entre individuos de diferentes especies (Nordlund et al., 1981). En Wyatt (2003) se puede encontrar una excelente discusión sobre la amplia gama de diferentes semioquímicos, sus funciones y los problemas asociados a su definición; aquí sólo daremos una breve visión general. En general, se supone que las feromonas son mutuamente beneficiosas para el emisor y el receptor. Dependiendo de la interacción que median, las feromonas pueden subdividirse según su función: sexuales, de agregación, de alarma, etc. Las feromonas pueden actuar a diferentes escalas de tiempo: las feromonas liberadoras, median respuestas de comportamiento inmediatas; mientras que las feromonas iniciadoras, provocan respuestas fisiológicas o de desarrollo a largo plazo. A diferencia de las feromonas, los aleloquímicos se subdividen en función de quién se beneficia de la interacción que median: las kairomonas son señales beneficiosas sólo para el receptor (como cuando los depredadores o los herbívoros localizan a sus presas o huéspedes por su olor); las alomonas son beneficiosas sólo para el emisor, y suelen estar implicadas en varios casos de engaño y otros casos de explotación del receptor; las sinomonas son beneficiosas tanto para el emisor como para el receptor, como cuando las flores anuncian recompensas de néctar a cambio de polinización. Obsérvese que una misma señal química puede clasificarse simultáneamente como más de un tipo de semioquímico si intervienen más de dos actores. Una feromona puede, por ejemplo, funcionar también como kairomona si la utiliza un depredador para localizar a su presa.

2.1.3 Orientación hacia fuentes de información química

Muchas interacciones olfativas implican orientación hacia fuentes de olor atractivas. Si el olor va acompañado de puntos de referencia visuales conspicuos, como suele ser el caso de las flores, la orientación puede ser en parte guiada por señales visuales. En ocasiones, las sustancias volátiles son depositadas por animales que se desplazan por un sustrato, generando un rastro que es relativamente fácil de seguir. Sin embargo, normalmente los animales

deben orientarse mediante compuestos que no son depositados, sino que son directamente liberadas al medio. En estas situaciones, las moléculas de olor se dispersan desde una fuente mediante la acción combinada de la difusión y el flujo de corriente del medio. La difusión es un proceso lento, que crea un volumen en expansión de concentración gradualmente decreciente a medida que se aleja de la fuente de olor. La difusión domina en situaciones con poco flujo de masa, en condiciones protegidas cerca de la fuente de olor o en capas límite con poco flujo de aire cerca de los sustratos (Dusenbery, 1992; Greenfield, 2002). En estas situaciones, la orientación hacia las fuentes de olor puede llevarse a cabo siguiendo gradientes de olor si los animales son capaces de monitorear su concentración en el tiempo, cambiando de dirección en respuesta a los cambios en la concentración. Sin embargo, en la mayoría de las situaciones, los efectos del flujo de aire (o de agua) dominarán sobre la difusión; esto puede generar una pluma de olor que serpentea a favor del viento desde la fuente. Debido a turbulencias, la pluma de olor se dividirá en paquetes de alta concentración de olor intercalados con aire limpio, dando lugar a un estímulo dinámico con concentraciones de olor que fluctúan rápidamente en el tiempo (Murlis et al., 1992). Los animales que navegan en plumas de olor suelen emplear la anemotaxis (es decir, se mueven a favor del viento mientras están en contacto con la pluma de olor). Si pierden el contacto con la pluma, cambian a movimientos laterales en un intento de restablecer el contacto.

Las plumas de olor de varias fuentes se mezclarán en el aire en distinto grado, y la integridad de la información depende de la eficacia con la que los animales puedan separar los paquetes de olor procedentes de dichas plumas. Los insectos que vuelan contra el viento se encuentran con paquetes de olores de diferentes fuentes en secuencia, lo que les permite distinguir plumas parcialmente mezcladas basándose en el momento de la llegada. Los experimentos con plumas entremezcladas han demostrado que las polillas pueden diferenciar muy bien las fuentes de olor, en algunos casos, incluso cuando están separadas por sólo unos milímetros (Baker et al., 1998).

2.1.4 Ecología química de *Sirex noctilio*

Como se detalló en el capítulo introductorio, las hembras de *S. noctilio* tienen una gran preferencia por aquellos árboles estresados. En este sentido, Madden (1977), demostró que el estrés fisiológico de un árbol da lugar a un

deterioro de la translocación, pero a una mayor transpiración y respiración del floema. Esto aumenta la permeabilidad de los tejidos y la tasa de pérdida de vapor de agua y monoterpenos. Estos cambios fisiológicos favorecen la atracción de la hembra de *S. noctilio*, la deposición de huevos y el establecimiento de *A. areolatum*. La acción del hongo y el mucus refuerza la condición de estrés en el árbol, lo que resultaría en un bucle de retroalimentación de mayor susceptibilidad y la probabilidad de nuevos ataques (Ryan & Hurley, 2012).

En lo que respecta a compuestos químicos emitidos por conespecíficos, un estudio preliminar de laboratorio indica que los machos de *S. noctilio* poseen una fuerte respuesta de flexión del abdomen cuando se les presentaron hembras muertas por congelamiento (datos no publicados Crook, 2008). Esta respuesta de los machos estuvo ausente cuando se eliminó el recubrimiento cuticular de las hembras muertas sumergiendo la hembra en hexano. Estos resultados preliminares sugieren la importancia de los compuestos cuticulares producidos por las hembras en el comportamiento de apareamiento de *S. noctilio*. En un estudio más reciente se ha identificado un volátil de proximidad producido por los machos que es activo tanto en las hembras como en los machos en los ensayos de laboratorio (Cooperband et al., 2012), pero no en el campo (Hurley et al., 2015). Más allá de estos trabajos, todavía no ha sido posible encontrar una respuesta de atracción lo suficientemente fuerte como para ser utilizada en los métodos de seguimiento específicos de la especie.

En cuanto a la interacción con otros organismos asociados, como hemos visto, se ha sugerido que el éxito de la búsqueda de hospedadores por parte de *S. noctilio* puede depender tanto de COVs de la planta hospedadora como del simbiote *A. areolatum* (Bashford, 2008; Costello et al., 2008; Erbilgin et al., 2017). Investigaciones anteriores, han mostrado una atracción relativamente fuerte de las hembras de *S. noctilio* hacia el hongo *A. areolatum* cultivado en medio de cultivo artificial, en pruebas de olfatometría (Fernández Ajó et al., 2015). A pesar de los estudios realizados, falta información detallada sobre cómo los volátiles emitidos por el simbiote que crece en la madera podrían regular el comportamiento de las avispas hembras.

2.1.5 Objetivo

En esta sección, se propuso evaluar la relevancia de los volátiles emitidos por el hongo creciendo en diferentes condiciones (es decir, medio artificial o madera de dos especies de árboles hospedadores: *Pinus contorta* y *Pinus ponderosa*) sobre el comportamiento olfativo de las hembras adultas de *S. noctilio*. Es importante recordar que en la Patagonia, *P. contorta* y *P. ponderosa* se encuentran entre los pinos más cultivados y ambos son susceptibles al ataque de *S. noctilio*. Sin embargo, *P. contorta* es frecuentemente afectado, mientras que *P. ponderosa* raramente (Lantschner & Corley, 2015). Específicamente se propuso identificar las *claves químicas* que permitan maximizar la atracción de hembras de la avispa *S. noctilio*.

2.1.6 Hipótesis y predicciones

La avispa *Sirex noctilio* evolucionó en entornos donde los pinos susceptibles son nativos y se encuentran en bosques mixtos, junto con otras especies leñosas. En las zonas en las que se ha introducido, *S. noctilio* suele encontrarse en bosques de pinos comerciales sanos de pocas especies, donde el entorno tiende a ser más homogéneo. En cualquiera de estos escenarios, encontrar un huésped adecuado puede ser un proceso complejo. La detección de un árbol previamente atacado, seguida de una oviposición (y por lo tanto una agregación a nivel árbol), podría resultar ventajosa para el desarrollo de las larvas, tanto a nivel nutricional como por las posibilidades de superar las defensas del árbol por la inoculación del hongo y el veneno fitotóxico. En este contexto, se planteó la siguiente hipótesis y predicciones:

H1: Las hembras de *S. noctilio* utilizan volátiles fúngicos y del pino para detectar árboles previamente atacados.

P1.1: Las hembras adultas de *S. noctilio* mostrarán una preferencia comportamental hacia el hongo simbiote con crecimiento en condiciones naturales (madera de *P. contorta* y *P. ponderosa*), frente al hongo que crece en medios artificiales o la madera sin hongo.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Insectos

Para realizar ensayos comportamentales frente a diferentes fuentes de volátiles, se obtuvieron hembras adultas de *S. noctilio* a partir de trozas de *P. contorta* atacado naturalmente en el noroeste de la Patagonia, Argentina: Estancia Fortín Chacabuco (Neuquén, 41°0'14.657"S, 71°10'7.775"O) y Comunidad Mapuche Linares (Junín de los Andes, Neuquén, 39°36'3.6"S, 71°3'6.657"O). Los árboles fueron seleccionados y talados en base a los síntomas típicos de *oviposición de S. noctilio* (es decir, árboles cloróticos y gotas de resina en el tronco). Luego, los árboles se cortaron en trozas de 0,8 m, se llevaron a las instalaciones de cría del Grupo de Ecología de Poblaciones de Insectos del Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de Bariloche (GEPI-IFAB) y se mantuvieron a temperatura ambiente y condiciones de iluminación natural en jaulas (0,8 x 0,8 x 0,8 m) hasta la emergencia adulta. Las hembras se recolectaron diariamente y se mantuvieron en recipientes individuales bajo temperatura y luz controladas (12 ± 1 ° C y fotoperiodo L16: D8) durante 3 ± 2 días, hasta ser utilizadas en los ensayos. Se desconoce el estado de apareamiento de las hembras, ya que es posible que algunas hembras se hayan apareado durante el corto periodo (<24h) que permanecieron con los machos en las jaulas de cría. Es importante señalar que la especie es partenogenética, por lo que las hembras vírgenes aún tienen capacidad de oviponer.

2.2.2 Olfatómetro

Para probar la respuesta comportamental de las hembras de *S. noctilio* hacia los estímulos olfativos, se utilizó un olfatómetro de cuatro vías (Figura 10). El dispositivo consistía en una arena experimental con un área central (13 cm²) y cuatro brazos simétricos. La longitud desde el centro hasta cada uno de los cuatro extremos del brazo era de 17,5 cm. Cada brazo estaba conectado a una cámara cilíndrica de vidrio (cámara de olor, 5,5 cm de largo; 2,5 cm de diámetro) donde se colocaban las fuentes de estímulos. Toda la arena fue cubierta por una tapa de vidrio (37 x 37 cm, 4 mm de espesor) para lograr un sellado hermético. Para generar el flujo de aire, se conectó una bomba de succión comercial convencional a un orificio ubicado en el centro de la arena con tubos de teflón. El

aire que entraba en el sistema a través de las cámaras de olor (3 l/min) se filtraba primero con carbón activado (0,5 kg) y se humidificaba burbujeándolo en agua destilada (1 l). La arena se iluminó con diodos emisores de luz blanca (LED) (2,5 m de tira de LED colocada en una circunferencia con un diámetro de 80 cm) a 150 cm centrados sobre el olfatómetro (60 W; Alic, Buenos Aires, Argentina).

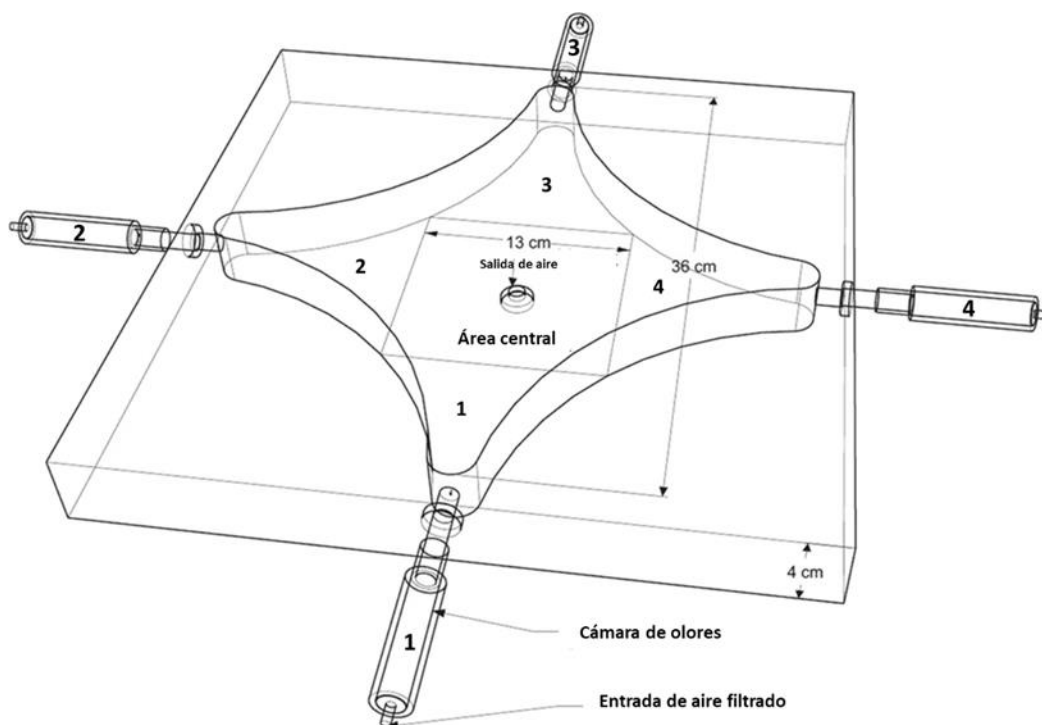


Figura 10. Olfatómetro utilizado en los bioensayos con hembras de *Sirex noctilio*. Los olores se presentaron en combinaciones por pares y se probaron 28 hembras en cada una de ellas. Crédito de la imagen: Martínez A.S.

2.2.3 Fuentes volátiles

Se evaluó en olfatómetro el comportamiento de hembras de *S. noctilio* frente a siete fuentes de volátiles: (i) Aire limpio (Aire), (ii) Medio de cultivo artificial (M-A), (iii) *A. areolatum* crecido en medio de cultivo artificial [Hongo (M-A)], (iv) *P. contorta* (Contorta), (v) *P. ponderosa* (Ponderosa), (vi) *A. areolatum* cultivado en *P. contorta* (Contorta+Hongo), (vii) *A. areolatum* cultivado en *P. ponderosa* (Ponderosa+Hongo). La fuente (i) consistió en cámaras de olores del olfatómetro vacías. La fuente (ii) consistió en un medio de cultivo estéril de agar, malta y levadura (Martínez et al. 2006) que se dejó durante 18 ± 3 días a 22 ± 1 °C y $65 \pm 5\%$ de humedad relativa (HR) en

la oscuridad. La fuente (iii) se obtuvo a partir de fragmentos de hifas extraídos de micangias de hembras de *S. noctilio* y cultivados en M-A. Las fuentes (iv) y (v) se obtuvieron mediante la tala de pinos de *P. contorta* y *P. ponderosa* (10 cm de diámetro a la altura del pecho). Una vez talados, se cortó una porción del tronco en discos (1 cm de grosor), los cuales se colocaron en placas de Petri individuales y se esterilizaron en autoclave (80 minutos a 120°C). Las placas de Petri con los discos de madera se mantuvieron en la incubadora a 22 ± 1 °C y $65 \pm 5\%$ de HR en la oscuridad durante 18 ± 3 días. Las fuentes (vi) y (vii) se obtuvieron inoculando fragmentos de hifas de *A. areolatum* procedentes de hembras de *S. noctilio* (ver fuente iii) en discos de *P. contorta* y *P. ponderosa* (ver fuentes iv y v), respectivamente. El hongo se dejó crecer a 22 ± 1 °C y $65 \pm 5\%$ de HR en la oscuridad hasta que toda la superficie del disco de madera estuvo cubierta de micelio (18 ± 3 días).

2.2.4 Ensayos comportamentales

Dos horas antes de los experimentos, las avispas hembras se trasladaron de la incubadora a una sala de aclimatación con luz artificial, 24 ± 1 °C y $65 \pm 5\%$ HR. Se introdujo una sola avispa en la zona central del olfatómetro. Una vez liberada, se le dio 2 minutos para que se aclimatara dentro del olfatómetro. Tras este periodo, se grabó el movimiento de la avispa con una webcam centrada a 150 cm por encima del olfatómetro (Facecam 1000 Genius,) a 5 fotogramas/s durante 10 min. Todos los bioensayos se realizaron en condiciones controladas (24 ± 1 °C de temperatura y $65 \pm 10\%$ HR). En cada ensayo, se probaron 28 hembras adultas de *S. noctilio*. El olfatómetro se utilizó en dos sentidos, ya que se presentaron dos fuentes de estímulos volátiles simultáneamente a las avispas individuales en cada réplica (Tabla 1). Así, en cada ensayo, dos ramas del olfatómetro contenían la misma fuente de volátiles y las otras dos contenían una fuente diferente. Las mismas fuentes de volátiles se colocaron siempre en brazos adyacentes y sus posiciones se rotaron según un esquema predefinido cada dos ensayos para minimizar los sesgos de orientación. Cuando se utilizó madera o medio de cultivo artificial como fuentes volátiles (fuentes ii-vii), se introdujo una porción rectangular (2,5 cm x 1 cm x 1 cm) de la fuente en cada cámara. Al contrastar la respuesta hacia el aire, se dejaron vacías dos cámaras adyacentes. Después de cada réplica, se renovaron las fuentes volátiles y las cámaras de arena y de olor se enjuagaron a fondo

con agua, alcohol y hexano. Además, se realizaron dos controles: Aire vs. Aire (control del sistema) y Medio de cultivo artificial (M-A) vs. Aire.

Estímulo 1 \ Estímulo 2	Hongo (M-A)	Contorta	Ponderosa	Contorta+Hongo	Ponderosa+Hongo
Aire					
Hongo (M-A)					
Contorta					
Ponderosa					
Contorta+Hongo					

Tabla 1. Combinaciones por pares (celdas resaltadas en gris) de 6 fuentes de olor presentadas a una hembra de *Sirex noctilio* en el olfatómetro durante un bioensayo de 10 minutos. Los ensayos de control no se muestran en la tabla por motivos de claridad (es decir, aire vs. aire y medio de cultivo artificial (M-A) vs. aire).

2.2.5 Análisis de los datos de olfatometría

Los archivos de vídeo grabados para cada avispa se utilizaron para determinar su posición (coordenadas x e y en píxeles) en cada fotograma utilizando el software ImageJ (Rasband, 2016). Se calculó el porcentaje de tiempo que permaneció en cada zona de olor durante el bioensayo. Para ello, se excluyó del análisis la permanencia en la zona central. Los porcentajes de tiempo transcurrido en las zonas de olor para cada contraste de fuentes volátiles se compararon con pruebas de rango con signo de Wilcoxon, ya que los datos no cumplían los supuestos de normalidad. Para descartar posibles efectos debidos a sesgos posicionales (es decir, la posición del olfatómetro), se realizó una prueba adicional de rangos con signo de Wilcoxon considerando la respuesta de las avispas en relación con cada uno de los brazos del olfatómetro (1-4). Todos los análisis estadísticos se realizaron con R (versión 3.6-2) (R Core Development Team 2019).

2.2.6 Índice de Preferencia Olfativa (IPO)

Se diseñó un Índice de Preferencia Olfativa (IPO) ad hoc para clasificar la intensidad de la preferencia en las respuestas globales hacia las seis fuentes de olor: Aire, Hongo (M-A), Contorta, Ponderosa, Contorta+Hongo y

Ponderosa+Hongo. El IPO se basa en la significancia estadística (p-valores de las pruebas de rango con signo de Wilcoxon) de una fuente particular frente a las otras cinco fuentes probadas.

Para cada contraste de la prueba de rangos con signo de Wilcoxon, el p-valor se convirtió en una puntuación de Preferencia Olfativa Parcial (POP) asignando una puntuación arbitraria comprendida entre 2 y -2 (Tabla 2). El IPO para una fuente de olor específica se conformó entonces sumando todas las POPs que implicaban a esa misma fuente de olor (por ejemplo, $-5,5$ (IPOAire) = $-1,5$ (POPvs.Hongo(M-A)) + 0 (POPvs.Contorta) - 2 (POPvs.Contorta+Hongo) + 0 (POPvs.Ponderosa) - 2 (POPvs.Ponderosa+Hongo).

<i>p</i> -valor	Puntaje parcial si el estímulo fue preferido	Puntaje parcial si el otro estímulo fue preferido
$p < 0.001$	2	-2
$p < 0.01$	1,5	-1,5
$p < 0.05$	1	-1
$p \geq 0.05$	0	

Tabla 2. Preferencia Olfativa Parcial (POP) asignada a cada estímulo según el resultado de las pruebas de comportamiento. La puntuación considera la significancia estadística de un determinado contraste entre dos fuentes y asigna una puntuación parcial arbitra entre 2 y -2 a la respuesta evocada hacia cada fuente evaluada en ese contraste. Por ejemplo, en el caso del contraste entre Aire y Hongo, en el que se prefirió al Hongo frente al Aire con una significancia estadística de $p < 0,01$, se asignó un POP de +1,5 al Hongo y un POP de -1,5 al Aire. El IPO se conformó entonces sumando todos los POPS obtenidos de cada contraste en el que se probó una fuente de olor particular.

2.3 Resultados

2.3.1 Respuesta en olfatómetro

Las respuestas de las hembras de *Sirex noctilio* en los controles fueron simétricas (Aire vs. Aire, $n=28$, $\chi^2=1,66$, $p > 0,05$ y Aire vs. M-A, $n=28$, $\chi^2 = 1,53$, $p > 0,05$), lo que confirma un buen funcionamiento del olfatómetro y que el M-A no genera atracción cuando es contrastado contra aire. En contraposición, se detectó una preferencia por parte de las hembras hacia el Hongo (M-A) cuando se presentó frente al Aire ($n=28$, $\chi^2 = 7,87$, $p < 0,01$) (Figura 11). No se observaron diferencias significativas en la respuesta de las hembras cuando se presentó Contorta frente a Aire ($n=28$, $\chi^2 = 2,08$, $p > 0,05$) ni ante Ponderosa frente a Aire ($n=28$, $\chi^2 = 0,99$, $p > 0,05$). Cuando se contrastó la

respuesta hacia el Hongo (A-M) frente a *P. contorta*, se observó un sesgo comportamental hacia esta última fuente ($n=28$, $\chi^2 = 3,87$, $p < 0,05$), mientras que no se observaron diferencias significativas cuando se contrastó el Hongo (M-A) con *P. ponderosa* ($n=28$, $\chi^2 = 0,0003$, $p > 0,05$). Se observó un sesgo en la respuesta hacia *P. contorta* cuando se contrastó con *P. ponderosa* ($n=28$, $\chi^2 = 5,18$, $p < 0,05$).

Al contrastar Contorta+Hongo contra Aire registramos un claro sesgo de las hembras de *S. noctilio* hacia el estímulo que contenía la madera del hospedador con el simbionte ($n=28$, $\chi^2 = 12,19$, $p < 0,001$). No se observó ningún sesgo en la respuesta entre Contorta+Hongo y Hongo (M-A) ($n=28$, $\chi^2 = 0,67$, $p > 0,05$). Se observó un claro sesgo hacia Contorta+Hongo cuando se contrastó con Contorta y Ponderosa ($n=28$, $\chi^2 = 8,24$, $p < 0,01$, $\chi^2 = 21,36$, $p < 0,001$). Al contrastar Ponderosa+Hongo frente a Aire registramos un claro sesgo de las hembras de *S. noctilio* hacia el estímulo que contenía el otro potencial hospedador con el simbionte ($n=28$, $\chi^2 = 20,60$, $p < 0,001$). No se observaron diferencias significativas en los contrastes que incluían Ponderosa+Hongo y Hongo (M-A) ($n=28$, $\chi^2 = 0,67$, $p > 0,05$), mientras que cuando se probó Ponderosa+Hongo frente a Contorta o Ponderosa, se prefirieron estos últimos ($n=28$, $\chi^2 = 11,84$, $p < 0,001$, $\chi^2 = 5,15$, $p < 0,05$). Por último, ambas especies de pino con el hongo creciendo sobre ellas dieron lugar a respuestas similares ($n=28$, $\chi^2 = 0,47$, $p > 0,05$).

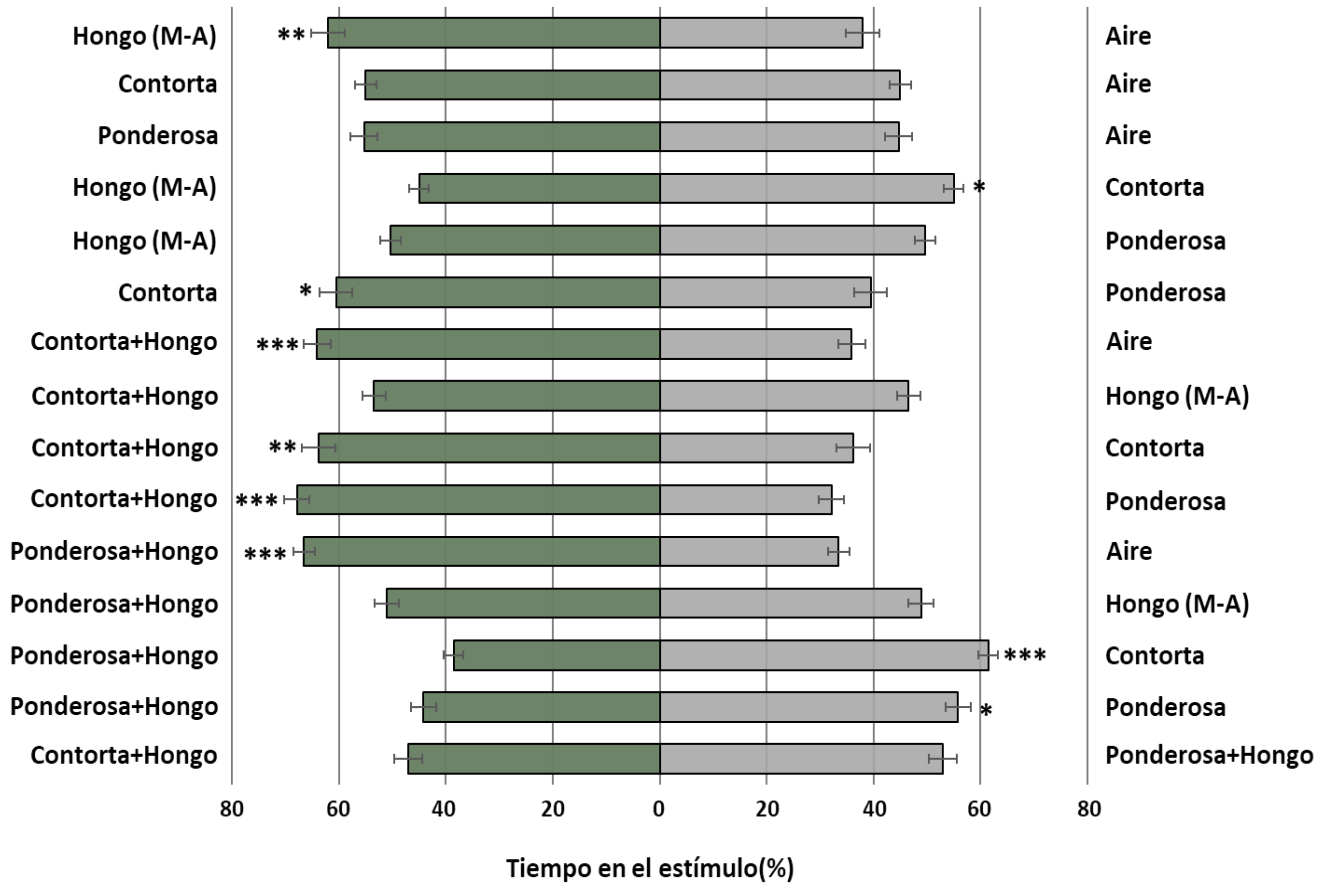


Figura 11. Respuestas comportamentales de las hembras de *Sirex noctilio* en un olfatómetro hacia combinaciones de aire limpio (Aire), hongo cultivado en medio de cultivo artificial (Hongo (M-A), madera de *Pinus contorta* (Contorta), madera de *Pinus ponderosa* (Ponderosa), hongo cultivado en madera de *P. contorta* (Contorta+Hongo), y hongo cultivado en madera de *P. ponderosa* (Ponderosa+Hongo) (n=28 hembras). Las combinaciones de a pares de las fuentes de olor se detallan a la derecha y a la izquierda de la figura. Las barras representan la media (\pm error estándar) del porcentaje de tiempo empleado en la zona correspondiente al estímulo. Los resultados significativos se indican con asteriscos (*:p<0,05, **:p<0,01, ***:p<0,001) mientras que los contrastes no significativos (P>0.05) no se indican.

2.3.2 Índice de preferencia olfativa

El IPO indica una jerarquía en términos de la preferencia de las avispas hembra hacia las 6 fuentes presentadas (Figura 12, Tabla 3). El estímulo que resultó ser el más preferido en la clasificación según la evaluación fue Contorta+Hongo (IPO=5,5), seguido de Contorta y Hongo (IPO=2,5 y 0,5, respectivamente). Los estímulos relativamente menos preferidos fueron Ponderosa+Hongo (IPO=-1), Ponderosa (IPO=-2) y, por último, aire (IPO=-5,5).

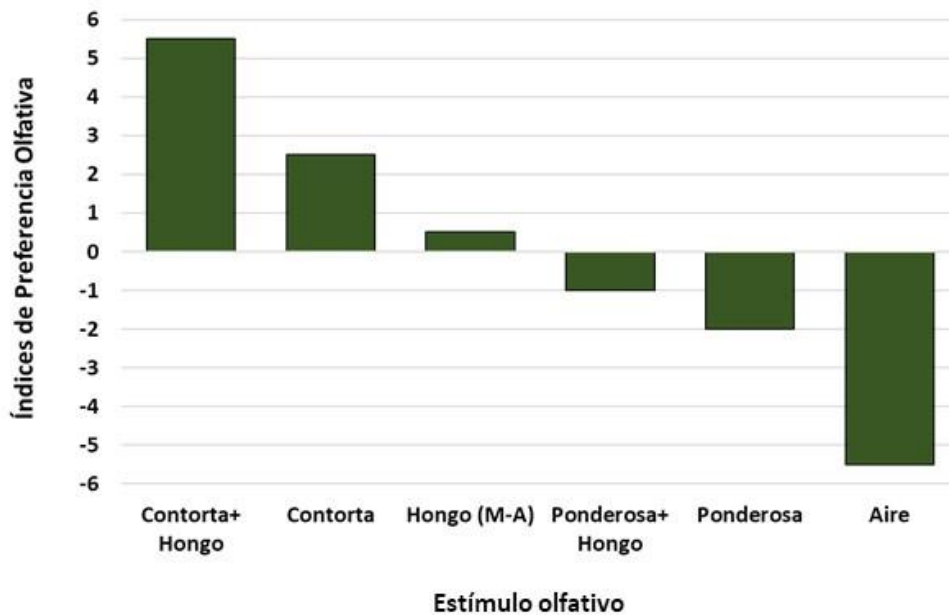


Figura 12. Índices de Preferencia Olfativa (IPO). Índices de preferencia olfativa obtenidos a partir de ensayos en olfatómetro realizados con hembras de *Sirex noctilio*. El índice considera la significancia estadística de un contraste particular entre dos olores específicos y asigna una puntuación parcial arbitraria entre 2 y -2 a la respuesta evocada hacia cada fuente evaluada en ese contraste. Por ejemplo, en el caso de Aire vs. Hongo (M-A), donde el Hongo fue preferido sobre el Aire con una significancia estadística de $p < 0,01$, se asignó una puntuación parcial de +1,5 al Hongo y una puntuación de -1,5 al Aire. El IPO se conformó entonces sumando todas las puntuaciones parciales obtenidas de cada contraste en el que se probó una fuente de olor.

Estímulos	La fuente preferida	POPS	No hay preferencias	POPS	La otra fuente fue preferida	POPS	IPO
Contorta + Hongo vs.	Contorta, $p < 0,01$	1,5	Hongo(M-A), $p > 0,05$	0		0	5,5
	Ponderosa, $p < 0,001$	2	Ponderosa+Fungus, $p > 0,05$	0			
	Aire, $p < 0,001$	2					
Contorta vs.	Hongo(M-A), $p < 0,05$	1	Aire, $p > 0,05$	0	Contorta+Hongo, $p < 0,01$	-1,5	2,5
	Ponderosa+Hongo, $p < 0,001$	2					
	Ponderosa, $p < 0,05$	1					
Hongo vs.	Aire, $p < 0,01$	1,5	Contorta+Hongo, $p > 0,05$	0	Contorta, $p < 0,05$	-1	0,5
			Ponderosa+Hongo, $p > 0,05$	0			
			Ponderosa, $p > 0,05$	0			
Ponderosa + Hongo vs.	Aire, $p < 0,001$	2	Contorta+Hongo, $p > 0,05$	0	Contorta, $p < 0,001$	-2	-1
			Hongo(M-A), $p > 0,05$	0	Ponderosa, $p < 0,05$	-1	
					Contorta+Hongo, $p < 0,001$	-2	
Ponderosa vs.	Ponderosa+Hongo, $p < 0,05$	1	Hongo(M-A), $p > 0,05$	0	Contorta, $p < 0,05$	-1	-2
			Aira, $p > 0,05$	0			
Aire vs.		0	Contorta, $p > 0,05$	0	Hongo(M-A), $p < 0,01$	-1,5	-5,5
					Contorta+Hongo, $p < 0,001$	-2	
			Ponderosa, $p > 0,05$	0	Ponderosa+Hongo, $p < 0,001$	-2	

Tabla 3. Conformación de los Índices de Preferencia Olfativa (IPO). Índices de preferencia olfativa (IPO) obtenidos mediante la suma de las puntuaciones parciales de preferencia olfativa (POPS) de las pruebas de comportamiento olfativo de las hembras de *Sirex noctilio* con seis fuentes olfativas diferentes presentadas en combinaciones por pares. El OPI se utilizó para clasificar la preferencia hacia los estímulos probados de las hembras.

2.4 Discusión

Nuestros resultados son los primeros en reportar el comportamiento de las hembras de *S. noctilio* hacia combinaciones de señales químicas emitidas por su simbionte *A. areolatum*, en crecimiento en diferentes especies de árboles hospederos. Según lo observado, ambas especies de pino inoculadas con el hongo en crecimiento mostraron ser fuertes atrayentes por sí solas cuando se contrastaron con el aire. Sin embargo, en cuanto a los resultados globales, se encontró una clara jerarquía en las preferencias olfativas por parte de las hembras de *S. noctilio*, con el mayor nivel hacia los volátiles liberados por el simbionte *A. areolatum* creciendo en *P. contorta*, seguido de *P. contorta* sólo y el hongo creciendo en medio de cultivo artificial. Curiosamente, el nivel de preferencia hacia *P. contorta* fue mayor que el observado para la especie huésped alternativa *P. ponderosa*, incluso con el crecimiento del hongo.

La clara preferencia de las hembras de *Sirex noctilio* hacia *P. contorta* en lugar de *P. ponderosa* podría ser el resultado de experiencias tempranas con el hospedador natal (i.e. las etapas previas a la emergencia transcurridas dentro del pino), ya que todas las hembras utilizadas en los bioensayos se obtuvieron de árboles infestados de *P. contorta*, porque es un desafío encontrar *P. ponderosa* con ataque de *S. noctilio* en la región (Lantschner & Corley, 2015). Es bien sabido que la preemergencia y la exposición temprana de los adultos a una determinada especie/cultivar huésped, puede afectar las preferencias olfativas en etapas posteriores del ciclo de vida (Storeck et al., 2000; Gandolfi et al., 2003; Dukas, 2008; Giunti et al., 2016). Por ejemplo, los adultos de la avispa parásita de los áfidos *Aphidus ervi* prefirieron los volátiles de las plantas hospedadoras infestadas de áfidos a los volátiles de las plantas intactas solo cuando habían estado expuestos a los volátiles de las plantas hospedadoras infestadas de áfidos durante las etapas de desarrollo (Takemoto et al., 2012). Alternativamente, las hembras podrían mostrar una preferencia hacia *P. contorta* debido a su quimiotipo único, independientemente de las especies hospederas donde las hembras hayan emergido. Es importante señalar que tanto *P. contorta* como *P. ponderosa* son nativos de Norteamérica, mientras que *S. noctilio* es de origen euroasiático. Cualquier respuesta innata positiva puede deberse a las similitudes en los perfiles volátiles de las especies de pinos de Norteamérica respecto a las especies

de árboles hospedadores euroasiáticos. Además, las diferencias en la preferencia podrían estar relacionadas con la estructura de la corteza (crítica en el momento de la oviposición) o la producción/composición de resina que podría percibirse a través de las diferencias en la composición de los volátiles (*P. ponderosa* tiene una corteza más gruesa y una mayor producción de resina que *P. contorta*) (Keeley & Zedler, 1998; Martinson et al., 2019). Queda por confirmar en futuros estudios si la jerarquía observada en los niveles de atracción hacia las fuentes analizadas es el resultado del entorno natal de la avispa o una diferencia debida a respuestas innatas. En este contexto, si las experiencias larvarias o adultas tempranas afectan al comportamiento en etapas posteriores de las hembras de *S. noctilio*, debe prestarse especial atención a la firma química de las especies de pino de monocultivo, ya que la integración de esta firma particular en un cebo utilizado para la región, podría maximizar su atractivo.

Nuestros resultados globales sugieren que tanto el hongo como la madera son claramente relevantes para las hembras de *S. noctilio*, y que las emisiones volátiles de una determinada especie de pino posiblemente potencian las respuestas de las hembras. Más allá de los resultados generales mencionados, vale la pena referirse a algunos particulares. Resulta interesante ver que, en principio, las hembras no mostraron una preferencia hacia las maderas de ambas especies de pino cuando se las enfrentó con aire puro. Pero la presencia del hongo en ambas especies de pino provocó una clara preferencia por parte de las hembras hacia estas fuentes al ser enfrentadas con aire. Esta preferencia hacia la madera con el simbionte en crecimiento se observó de manera más consistente cuando nos referimos a la especie de pino preferida (*P. contorta*). Esta fuente siempre fue preferida, salvo en los casos donde el estímulo que se enfrentaba contenía hongo, lo cual también es algo para destacar. En todos los casos donde las dos fuentes enfrentadas contenían hongo, no se observaron preferencias. Distinto es el caso para *P. ponderosa* con el hongo en crecimiento, donde más allá de que la interacción del hongo con la madera resultó relevante (y produjo una preferencia de las hembras hacia esta fuente cuando se la enfrentó con aire puro), resulta curioso que cuando esta fuente se enfrentó con madera de ambas especies de pino sin el hongo, estas últimas resultaron ser preferidas. No resulta tan extraño para el caso donde se enfrentó con *P. contorta*, ya que esta

especie es la preferida por las hembras. Lo que resulta particular es que la madera de *P. ponderosa* sin el hongo, haya sido en este caso puntual preferida frente a la madera de este pino con el simbionte.

En cuanto a las posibles especulaciones acerca de qué podría estar sucediendo a nivel sensorial en las hembras, podríamos plantear distintos escenarios. Schröder & Hilker (2008), por ejemplo, propusieron un marco que discierne el papel de los olores de fondo con los liberados por un recurso concreto (olores indicadores de recursos - OIR), durante el proceso de orientación de los insectos. Por lo tanto, los autores sugieren que la respuesta hacia un estímulo volátil específico que indica un recurso podría estar modulada por la percepción de otros volátiles. Estos olores de fondo, que incluyen los volátiles del hábitat en el que forrajean los insectos, pueden ser irrelevantes, enmascarar los OIR o "agudizar la vista" aumentando la respuesta hacia una fuente. La avispa de la madera *Sirex noctilio* ha evolucionado en un entorno forestal mixto, donde los pinos susceptibles se encuentran en una matriz compleja e impredecible que también contiene otras especies de árboles. Los volátiles fúngicos podrían señalar lugares específicos dentro de los pinos que son más adecuados para el desarrollo de las larvas, transmitiendo a la descendencia una ventaja de fitness (Thompson et al., 2014; Fernández Ajó et al., 2015). En este escenario, un olor de fondo producido por un potencial hospedador en combinación con las emisiones del hongo simbiótico en crecimiento (OIR) podría aumentar la atracción de las hembras cuando se perciben conjuntamente. En estudios anteriores se han registrado interacciones entre los olores de fondo y los OIR. Por ejemplo, Landolt et al. demostraron que las hembras de la polilla de la col, *Trichoplusia ni* (Hübner) eran atraídas con mayor frecuencia en un túnel de vuelo por las feromonas masculinas cuando se combinaban con follaje de algodón.

Sin embargo, nuevamente es importante destacar que existen múltiples posibilidades acerca de lo que podrían estar percibiendo a nivel sensorial las hembras de *S. noctilio* y que en última instancia es lo que desencadena las respuestas comportamentales. Podría existir un único compuesto relevante en alguna de las fuentes particulares estudiadas responsable de estas respuestas, podría existir un complemento entre distintos compuestos (ej. efecto de sinergia), entre otras posibilidades. Estudios de respuesta electrofisiológica de las hembras hacia los

compuestos específicos emitidos por estas fuentes evaluadas, podrían dar lugar a una mejor interpretación de este proceso.

Se puede decir entonces que los resultados obtenidos son acordes a la hipótesis y predicciones planteadas. Particularmente para la especie de pino preferida, la presencia e interacción con el hongo simbiote resultó en la mayor preferencia de las hembras en cuanto a las fuentes evaluadas. Más allá de los resultados particulares, para la especie menos preferida, la presencia del hongo también resultó claramente relevante. Estos resultados no sólo resultan valiosos en cuanto al conocimiento acerca de la biología y ecología de *S. noctilio* sino también son una base fundamental en la búsqueda de semioquímicos atrayentes para esta plaga.

Capítulo 3. Respuesta antenal de *Sirex noctilio* hacia compuestos volátiles emitidos por el hongo simbiote *Amylostereum areolatum* en distintos medios de crecimiento

3.1 Introducción

3.1.1 Quimiorrecepción en insectos

Los insectos utilizan la información química durante cualquier fase de su orientación, a menudo en una serie de decisiones escalonadas que van desde la búsqueda del hábitat adecuado, pasando por la identificación de un recurso, hasta la evaluación final de su idoneidad mediante la quimiorrecepción de contacto. Aunque el mundo está lleno de potenciales odorantes, la mayoría de los insectos parecen utilizar sólo una pequeña fracción, basando sus decisiones en un número muy limitado de compuestos clave.

En los insectos, las señales olfativas son detectadas principalmente por las antenas y, en menor medida, por los palpos maxilares. Las unidades sensoriales básicas de los artrópodos son las sensilias. Estas presentan neuronas receptoras olfativas (NROs), las cuales son bipolares. En un extremo contienen a los receptores olfativos (ROs) que, al ligar con una molécula odorífera (y mediante la interacción con otras moléculas), desencadena un potencial de acción que es transportado a través del axón hacia el otro extremo (Shields & Hildebrand, 2001). A continuación, la información se envía hacia centros olfativos superiores (en ppio. principalmente al lóbulo antenal) (Stocker et al., 1990; Malun et al., 1993; Anton & Homberg, 1999; Marin et al., 2002; A. M. Wong et al., 2002; Kanzaki et al., 2003; Christensen, 2004). Finalmente, puede producirse (o no) una respuesta, por ejemplo, de tipo comportamental atractiva o aversiva.

Cualquier odorante individual podría servir potencialmente para identificar una fuente, siempre que se libere exclusivamente de ésta. En algunos casos, sustancias químicas específicas o clases de sustancias químicas pueden asociarse de forma fiable con determinadas fuentes, como los isotiocianatos de alilo liberados por las plantas crucíferas, ciertos sulfuros liberados por las cebollas (Visser, 1986) y otros sulfuros liberados por las proteínas en

putrefacción (Stensmyr et al., 2002). No es de extrañar que estos compuestos sean a menudo potentes estímulos para los especialistas que los explotan, mientras que la mayoría de las demás especies los evitan. Aparentemente, muchos volátiles de las flores también son lo suficientemente fiables como para provocar una atracción significativa. En realidad, este nivel de especificidad rara vez se encuentra, y los insectos utilizan otras estrategias que implican combinaciones de sustancias químicas raras y muy comunes, para identificar los recursos. Estos químicos, a veces liberados en proporciones estrechamente definidas, proporcionan al organismo información específica sobre la fuente y median el comportamiento apropiado, como la búsqueda, la evitación o la agresión. Las mezclas de feromonas sexuales especie-específicas liberadas por las hembras, guían a los machos que buscan a las hembras de su misma especie. Otros olores informan sobre el parentesco, el estatus social o reproductivo, o si un individuo es un compañero de nido (Wyatt, 2003). Las sustancias químicas liberadas por el aliento y la piel, como como el dióxido de carbono, el 1-octen-3-ol y el ácido láctico, guían a los mosquitos hacia sus vertebrados y median un cierto grado de especificidad en, por ejemplo, los mosquitos antropófilos (Takken & Knols, 1999; Dekker et al., 2002). Muchas avispas parasitoides probablemente tendrían dificultades para detectar el olor de la presa cuando está escondida sobre, o incluso en el interior de una planta, pero aprovechan los volátiles liberados por las plantas hospedadoras en respuesta al ataque de los herbívoros (Dicke & Van Loon, 2000). Muchas sustancias químicas podrían transmitir la información de que una fuente de olor es, de hecho, inadecuada como recurso y estas sustancias químicas median así la evitación o inhiben atracción (Schoonhoven et al., 1998; Wyatt, 2003).

Cuando decimos que ciertos compuestos forman una señal quimiosensorial, queremos decir que estos compuestos son suficientes para reproducir, al menos en alguna medida, el efecto de los estímulos naturales (véase: 5.1.1. Identificando las señales sensoriales). No está claro hasta qué punto los insectos utilizan la información de otras sustancias químicas liberadas por la misma u otras fuentes, o qué compuestos pueden percibir en concentraciones naturales. En última instancia, el tamaño y la complejidad del mundo quimiosensorial de cualquier organismo viene determinado por el alcance de los compuestos que su sistema quimiosensorial

puede detectar y distinguir; los insectos tienen aproximadamente un orden de magnitud menos de tipos de neuronas receptoras olfativas que los mamíferos (Pilpel & Lancet, 1999). Las pruebas disponibles sugieren que los conjuntos de receptores olfativos y gustativos de los insectos están, en gran medida, especializados para detectar aquellos semioquímicos que actúan en el proceso de identificación del huésped o de la pareja (Schoonhoven et al., 1998; Wyatt, 2003). En general, se considera que las neuronas receptoras de feromonas de los insectos son muy selectivas para los componentes individuales de las feromonas, y muchos estudios han demostrado también una ajustada sintonización en las neuronas receptoras para los olores no “feromonales” (Jönsson & Anderson, 1999; Shields & Hildebrand, 2001). Por tanto, el sistema quimiosensorial relativamente limitado de los insectos puede dar cabida tanto a una considerable amplitud como a una alta capacidad de discriminación junto con una elevada especificidad innata.

3.1.2 *Ecología química de Sirex noctilio: Compuestos orgánicos volátiles y respuesta antenal*

Los estudios que evalúan aspectos comportamentales de los insectos frente a estímulos químicos, suelen complementarse con el análisis de las respuestas antenales y la caracterización de los compuestos emitidos por las fuentes evaluadas. Desde hace tiempo, se han realizado estudios que se han centrado en los volátiles producidos por hospedadores de *S. noctilio* y han incluido este tipo de análisis complementario. Ya en los primeros trabajos relacionados con la ecología química de la avispa invasora, se han analizado las respuestas antenales frente a los volátiles emitidos por los pinos y se han caracterizado dichos compuestos (Simpson, 1976; Simpson & McQuilkin, 1976). Estos estudios mostraron, por ejemplo, que la composición de los hidrocarburos monoterpénicos (>95% de los volátiles recogidos) era bastante constante en el tiempo. En cuanto a la respuesta antenal, se observó un aumento de la respuesta al aumentar la edad del tronco. Estudios complementarios han reportado respuestas electrofisiológicas de *S. noctilio* a varios componentes del aceite de pino (Bashford & Madden, 2011). En general, todos estos trabajos han demostrado una predominancia de hidrocarburos monoterpénicos (ej., α y β pinenos, limonene, γ -terpinene, etc.). Algunos de estos compuestos generales (por ejemplo, los pinenos α y β en una proporción de 70:30, respectivamente) se utilizan para vigilar y controlar las

poblaciones de avispas hembras en las zonas afectadas (Bashford, 2008; Coyle & Gandhi, 2012; Barnes et al., 2014; Martínez et al., 2014; Hurley et al., 2015; Erbilgin et al., 2017; Batista et al., 2018; Allison, 2021). Sin embargo, no existe a la fecha una trampa cebada químicamente que resulte más efectiva que, por ejemplo, los árboles trampa. Estos últimos, como se mencionó en el capítulo introductorio, presentan una serie de limitaciones que es importante considerar (Zylstra et al., 2010; Martínez et al., 2014; Corley et al., 2019). En este sentido, resulta entonces relevante continuar y profundizar el estudio acerca de la ecología química de *S. noctilio*.

En la introducción del capítulo 2, nos referimos a estudios comportamentales realizados que sugirieron la presencia de compuestos cuticulares producidos por las hembras en el comportamiento de apareamiento de *S. noctilio*. Un análisis de los extractos de hexano de abdómenes de hembra realizado por Böröczky et al. (2009) reveló que los hidrocarburos saturados e insaturados fueron los principales componentes encontrados. El fraccionamiento del lavado corporal seguido de más pruebas de respuesta copulatoria del macho, condujo a la identificación de tres componentes de feromonas sexuales, (Z)-7-heptacoseno, (Z)-7-nonacoseno y (Z)-9-nonacoseno. Esta es la primera descripción de hidrocarburos cuticulares que sirven como componentes de feromonas sexuales de contacto en el suborden Symphyta, al que pertenece la familia Siricidae (Ayasse et al., 2001; Keeling et al., 2004). En esta línea, Cooperband et al. (2012), identificaron el (Z)-3-decen-1-ol y (Z)-4-decen-1-ol en efluvios de machos e informaron de que una mezcla 100:1:1 µg de (Z)-3-decen-1-ol, (Z)-4-decen-1-ol y (E,E)-2,4-decadienal resultaba atractiva en bioensayos con tubo en Y.

Finalmente, hemos visto que se ha sugerido que el éxito de la búsqueda de hospedadores por parte de *S. noctilio* puede depender tanto de los COVs de *A. areolatum* como de los volátiles de la planta hospedante, como (-)- α -pineno, β -pineno y etanol (Bashford, 2008; Costello et al., 2008; Erbilgin et al., 2017). En este sentido, algunos estudios han identificado los principales componentes de los COVs de *A. areolatum* (Jofré et al., 2016; Sarvary et al., 2016b; Wang et al., 2019). Sin embargo, falta información detallada sobre cómo los volátiles emitidos por el simbionte que crece en la madera podrían regular el comportamiento de las avispas hembras. En este sentido,

en base a los estudios realizados en el segundo capítulo de este trabajo, propusimos los siguientes objetivos e hipótesis.

3.1.3 Objetivos

Con el objetivo de encontrar atrayentes químicos que puedan ser implementados en el desarrollo de herramientas de monitoreo para *S. noctilio*, se investigó mediante estudios electroantenoográficos (CG-DEA) e identificación de compuestos volátiles (CG-EM), la relevancia de los COVs liberados por las mismas fuentes evaluadas a nivel comportamental en el capítulo anterior: *A. areolatum* cultivado en medio de cultivo artificial, en madera de *Pinus ponderosa* y en *Pinus contorta*. Estos estudios permiten comprender de mejor manera las capacidades sensoriales de las hembras de *S. noctilio*, el complejo entorno químico en el cual pueden desenvolverse y cuáles podrían ser los compuestos relevantes para el comportamiento de estos insectos.

3.1.4 Hipótesis y predicciones

Según los objetivos planteados y continuando con lo propuesto en el Capítulo 2, en esta sección particular se propuso lo siguiente:

H1: Las hembras de *S. noctilio* utilizan volátiles fúngicos y del pino para detectar árboles previamente atacados.

P2.2: Las hembras de *S. noctilio* mostrarán respuestas antenales a determinadas combinaciones de compuestos volátiles, según provengan de: el hongo simbiote creciendo en medio artificial, en madera del hospedador (*P. contorta* y *P. ponderosa*) o la madera sola. Dichas respuestas permitirán el discernimiento de las fuentes.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Insectos

Las hembras adultas de *S. noctilio* utilizadas en todos los experimentos se obtuvieron de *Pinus contorta* atacado en el noroeste de la Patagonia, Argentina: Estancia Fortín Chacabuco (Neuquén, 41°0'14.657"S, 71°10'7.775"O) y

Comunidad Mapuche Linares (Junín de los Andes, Neuquén, 39°36'3.6"S, 71°3'6.657"O). El proceso de selección y almacenamiento de material hasta la emergencia de los adultos utilizados en los experimentos se encuentra descrito en la Sección 2.2.1.

3.2.2 Colecta de volátiles

Se colectaron los volátiles emitidos por las mismas fuentes utilizadas en los ensayos comportamentales: (i) Aire, (ii) Medio de cultivo artificial (M-A), (iii) Hongo (M-A), (iv) Contorta, (v) Ponderosa, (vi) Contorta+Hongo y (vii) Ponderosa+Hongo. Para ello se utilizó un sistema de colecta de volátiles de 8 brazos (Figura 13). Se bombeó aire a 0,55 l/min a través de carbón activado a las bolsas del horno que contenían las fuentes de olor (tipo "oven bags", 30 cm x 45 cm Frozen's®, Argentina). El aire se extrajo de las bolsas con una bomba de vacío (0,5 l/min) pasando a través de una matriz polimérica adsorbente porosa (30 mg de HayeSepQ®) donde se retuvieron los volátiles. Se realizaron dos colectas de 4 placas de Petri/discos de madera por fuente de olor en la oscuridad y a una temperatura constante de 25 ± 1 °C y 65 ± 5 % de HR. Los volátiles se colectaron durante 24h. A continuación, los volátiles se eluyeron con 200 µl de diclorometano ($\geq 99,5\%$, Sintogran®) que contenían 5 ng de tridecano ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich®) como patrón interno. Por último, cada muestra se evaporó hasta el 50% del volumen total con un flujo de N₂. Para aumentar aún más la concentración y las diferentes muestras de la misma fuente de olor se agruparon para los análisis DEA y CG-EM.



Figura 13. Sistemas de colecta de volátiles de 8 brazos. Las colectas se realizaron mediante un equipo con el cual es posible concentrar y retener los compuestos volátiles emitidos por una fuente a través de filtros (polímeros porosos) y bombas diseñados para tal fin. Mediante una primera bomba (AIR FLOW), se emitió un flujo de aire purificado (carbón activado), el cual atravesaba una cámara (en este caso se trató de una adaptación elaborada con bolsas de nylon comerciales (bosas para horno)), donde se encontraba la fuente emisora de los volátiles. Luego se extrajo con una bomba de succión (VACUUM FLOW) a una velocidad constante de 0,5 litros min⁻¹. El aire que salió del receptor pasó a través de una matriz adsorbente de polímero poroso (30 mg de HayeSepQ[®]) donde se recolectaron los volátiles. Las colectas se realizaron en oscuridad y a una temperatura constante de 24°.

3.2.3 Respuesta antenal

Las antenas de las hembras adultas de *S. noctilio* (de 3 ± 2 días de edad) se cortaron con un cuchillo de disección y se expusieron a muestras volátiles de las fuentes evaluadas: (i) Aire (N=4 antenas), (ii) Medio de cultivo artificial (M-A) (N=7 antenas), (iii) Hongo (M-A) (N=8 antenas), (iv) Contorta (N= 7 antenas), (v) Ponderosa (N=8 antenas), (vi) Contorta+Hongo (N=8 antenas) y (vii) Ponderosa+Hongo (N=8 antenas). Todas las antenas utilizadas en cada ensayo se extrajeron de diferentes hembras y se utilizaron una vez. Para registrar la respuesta antenal hacia los

compuestos volátiles se utilizó un sistema de detección electroantegráfica (DEA Syntech, Alemania), acoplado a un cromatógrafo de gases (CG, Agilent 7890B, Agilent Technologies, Inc., EE.UU.) con un detector de ionización de llama (FID, en inglés) provisto de una columna capilar DB5 (0,25 mm de diámetro interior, espesor de película 0,25 μm , Agilent Technologies, Inc.) (Figura 14). El DEA constaba de 2 electrodos en forma de horquilla para el montaje de la antena (con gel conductor), conectados a un preamplificador de alta impedancia 10X. Éste se conectaba al sistema de adquisición de señales a través de un convertidor analógico-digital (iDAC-2, con filtros y amplificador) y finalmente a un PC. Una corriente constante de aire húmedo y filtrado bañaba la antena. El tubo por el que pasaba el aire estaba conectado a una electroválvula que se activaba mediante un "controlador de estímulos" (genérico), que se acciona desde un interruptor manual. Una vez montada la antena, esta electroválvula sólo se utilizó para aplicar los controles positivos (2 μl de α -pineno en un papel de filtro de 0,75 x 0,75 cm), sin utilizar la entrada del CG. Después de activar manualmente la electroválvula, se envió un pulso de aire limpio (2s) a la antena y se registró su respuesta. Dos minutos después de asegurarse de que la antena respondía correctamente al α -pineno ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), se inyectaron 2 μl de una muestra en el CG a 260 °C y se utilizó nitrógeno como gas portador a 0,75 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 35 °C durante 1 minuto, luego se incrementó a un ritmo de 5 °C/min hasta alcanzar los 100 °C, luego 12 °C/min hasta los 230 °C y se mantuvo durante 10 min. A medida que los compuestos salían, eran detectados por el FID y simultáneamente expuestos a la antena del insecto y se registraba su respuesta eléctrica. Por último, se realizaron los mismos controles positivos con α -pineno para evaluar la respuesta antenal al final del ensayo. Las antenas que no respondieron al α -pineno antes o después, fueron descartadas. Los parámetros para el registro y la grabación de las antenas se configuraron y analizaron con GcEad 2014 v1.2.5 (Syntech) y, además, se utilizó el software Chemstation (Agilent) para examinar los perfiles CG en detalle. Se consideraron respuestas verdaderas las observadas en al menos el 50% de las antenas ensayadas para cada fuente concreta.



Figura 14. Sistema de detección electroantenográfica (DEA Syntech, Alemania), acoplado a un cromatógrafo de gases (CG, Agilent 7890B, Agilent Technologies, Inc., EE.UU.) con un detector de ionización de llama (FID, en inglés). Se muestran imágenes del dispositivo y de antenas de *S. noctilio* “montadas” para registrar la respuesta antenal frente a los volátiles colectados de las distintas fuentes evaluadas.

3.2.3.1 Análisis de los datos

El análisis de las respuestas antenales se llevó a cabo con cinco de las fuentes de olor biológicamente relevantes: Hongo (M-A), Contorta, Ponderosa, Contorta+Hongo y Ponderosa+Hongo, (el aire y el medio de cultivo artificial se realizaron como controles) mediante un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, en inglés) utilizando la amplitud de la respuesta antenal. Para ello, se utilizó una matriz de distancia Bray-Curtis (paquete Vegan V2.4-6 para R). Para comprobar las diferencias en las respuestas antenales entre las fuentes, también se realizó un análisis multivariante de la varianza (perMANOVA) sobre la matriz de distancia basado en 9999 permutaciones. El análisis se realizó utilizando la función Adonis en R (paquete Vegan V2.4-6 para R). Para analizar el nivel de relevancia de los compuestos detectados en la ordenación y los resultados obtenidos, se analizaron los vectores correspondientes mediante la función data.envfit (paquete Vegan V2.4-6). Por último, a partir de un análisis cualitativo, se creó un diagrama de Venn donde se agruparon los compuestos producidos por una única

fueron fuente de olor y aquellos compartidos por dos o más. Todos los análisis estadísticos se realizaron con R (versión 3.6-2) (R Core Development Team 2019).

3.2.4 Identificación de compuestos volátiles de interés

Los compuestos volátiles obtenidos y evaluados en los ensayos de electroantenografía se identificaron provisionalmente (es decir, no confirmamos los compuestos mediante la inyección de patrones sintéticos) mediante un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A, Agilent Technologies, Inc.) equipado con una columna capilar DB5MS (diámetro interior de 0,25 mm, espesor de la película de 0,25 μm) y acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent 5977 selective mass detector, Agilent Technologies, Inc.). Las muestras (1 μl) se inyectaron a 240 °C en modo splitless. Se utilizó helio como gas portador a 0,75 ml/min. La rampa de temperatura empleada entonces fue la misma que la utilizada con la CC/FID-DEA.

3.2.4.1.1 Análisis de datos

Los compuestos se identificaron por "matching" computacional (>95%) con nuestra propia biblioteca de espectros de masas y una comparación de los índices de retención de Kovats y los espectros de los compuestos con datos publicados (Adams, 2007) y bases de datos de la web, (<https://www.pherobase.com/>, <https://webbook.nist.gov/> y <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). La adquisición de datos se realizó con el software de adquisición de datos MassHunter (versión B.06.00, Agilent Technologies, Inc.).

3.3 Resultados

3.3.1 Respuesta antenal

En el análisis por cromatografía de gases se detectaron un total de 515 compuestos a partir de todas las muestras analizadas. Según nuestros criterios de análisis, la CG-DEA mostró respuestas electrofisiológicas antenales a 62 de estos compuestos (Figura 15, Tabla 4). En el caso del Hongo (M-A) se registraron 16 respuestas positivas de 62 compuestos detectados; en el caso de Contorta, 15 respuestas positivas de 141 compuestos; en el de Ponderosa,

21 respuestas positivas de 120 compuestos; en el de Contorta+Hongo, 20 respuestas positivas de 93 compuestos; en el de Ponderosa+Hongo, 23 respuestas positivas de 99 compuestos. Para el Medio de Cultivo Artificial (M-A) observamos un total de 24 compuestos y 3 respuestas, que se descartaron de los análisis por no representar, a priori, estímulos ecológicamente relevantes (tampoco resultó ser un estímulo atractivo y los compuestos sólo aparecen en esta fuente). Además, se descartó un compuesto (Nonanal) ya que se observaron respuestas hacia él en todas las fuentes, incluido el sistema en blanco (Aire, no mostrado) y como tal se consideró un contaminante.

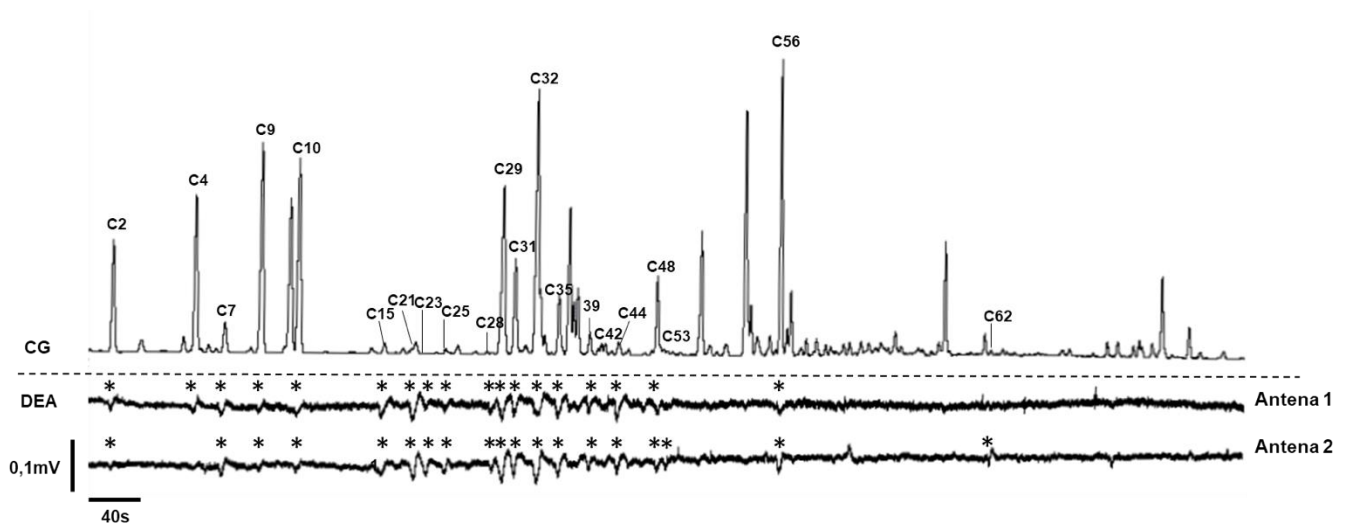


Figura 15. Ejemplo de una salida de CG-DEA. Arriba (CG), los compuestos detectados emitidos por Contorta+Hongo. Estos compuestos están numerados según la Tabla 4. Abajo, las respuestas acopladas de 2 antenas de *Sirex noctilio* (DEA) hacia los volátiles emitidos por esta fuente de olor. Los asteriscos señalan las respuestas antenales registradas.

ID	Compuesto	Kovats	Medio Artificial			Hongo (M-A)			Contorta			Ponderosa			Contorta+ Hongo			Ponderosa+ Hongo			p (NMDS)
			X̄ (mv)	Sd (mv²)	n	X̄ (mv)	Sd (mv²)	n	X̄ (mv)	Sd (mv²)	n	X̄ (mv)	Sd (mv²)	n	X̄ (mv)	Sd (mv²)	n	X̄ (mv)	Sd (mv²)	n	
C1	1-Hexanol	933																		*	
C2	α-Pineno	991							0,018	0,005	5	0,028	0,010	8	0,035	0,018	7	0,026	0,015	6	***
C3	P-Cimeno	1028																0,030	0,017	6	*
C4	β-Pineno	1035							0,023	0,009	6	0,038	0,011	8	0,028	0,010	5	0,026	0,015	6	***
C5	5-Hepten-2-ona	1046				0,022	0,011	8										0,038	0,023	7	***
C6	β-Mirceno	1049							0,024	0,009	6	0,034	0,015	7							***
C7	2-Amilfuran	1050												0,036	0,016	7	0,033	0,024	7	***	
C8	1065	1065				0,015	0,006	7													***
C9	3-Careno	1067							0,019	0,009	5				0,033	0,011	4	0,038	0,020	4	*
C10	β-Felandreno	1085												0,037	0,014	6					*
C11	D-Limoneno	1086										0,027	0,013	7				0,020	0,004	4	**
C12	γ-Terpineno	1114										0,023	0,006	4							*
C13	Acetofenona	1124				0,023	0,011	8													***
C14	1131	1131				0,022	0,010	6													**
C15	Epoxilinalool	1132							0,024	0,005	6	0,025	0,007	6	0,044	0,013	6	0,030	0,018	8	***
C16	1137	1137										0,024	0,006	4							ns
C17	Benceno(2-metil -1-propenil)	1141																0,020	0,009	6	*
C18	1148	1148				0,032	0,010	8													***
C19	1149	1149	0,018	0,007	5																
C20	2-Careno	1150							0,028	0,008	6	0,033	0,017	5							***
C21	1151	1151													0,062	0,027	8	0,094	0,093	8	***
C22	1154	1154	0,020	0,006	6																
C23	Metilbenzoato	1155				0,022	0,007	8	0,037	0,034	5				0,031	0,010	7	0,026	0,018	8	ns
C24	1,6-Octadien-3-ol	1161										0,022	0,005	4							*
C25	Nonanal	1165	0,020	0,006	6	0,024	0,011	8	0,028	0,006	5	0,034	0,015	8	0,037	0,013	6	0,023	0,011	7	
C26	Fenchol	1174										0,031	0,012	6							**
C27	Ment-2-en-1-ol	1181							0,025	0,005	5										*
C28	1189	1189										0,023	0,008	5	0,038	0,012	6	0,033	0,025	8	***
C29	4-Isopropilciclo hexanol	1195												0,060	0,033	8					**
C30	Nopinona	1196										0,041	0,016	8				0,031	0,017	6	**
C31	1203	1203				0,020	0,009	6						0,052	0,023	8	0,036	0,025	8	***	
C32	4-Isopropilciclo hexanona	1221												0,060	0,024	8					**
C33	trans-3-Pinanona	1222										0,043	0,015	8							**
C34	1223	1223																0,072	0,048	8	**
C35	cis-3-Pinanona	1238												0,049	0,013	8	0,068	0,053	5	***	
C36	4-Terpineol	1242							0,032	0,012	7	0,032	0,013	8							***
C37	P-Cimeno	1253															0,046	0,036	8	**	
C38	α-Terpineol	1256				0,019	0,012	5													*
C39	Estragole	1261				0,019	0,012	5				0,027	0,011	6	0,029	0,013	7	0,050	0,089	8	*
C40	Decanal	1268				0,018	0,011	6													**
C41	1272	1272										0,021	0,006	4							*
C42	Verbenona	1273				0,019	0,012	4						0,026	0,009	4	0,024	0,010	6	**	
C43	1278	1278										0,025	0,004	7							**
C44	Carona	1285												0,048	0,020	7	0,037	0,025	8	***	
C45	Cuminal	1288							0,020	0,005	4	0,023	0,010	4							**
C46	1296	1296							0,021	0,008	6										*
C47	P-Anisaldehído	1321				0,030	0,033	8													**
C48	Piperitona	1322												0,030	0,006	4					*
C49	1323	1323							0,025	0,009	6	0,037	0,013	8							***
C50	1330	1330	0,012	0,002	4																**
C51	1331	1331				0,020	0,007	6													**
C52	1332	1332															0,017	0,006	4	ns	
C53	1333	1333												0,035	0,016	4					ns
C54	1336	1336							0,017	0,005	6	0,027	0,009	4							***
C55	1376	1376															0,018	0,005	4	ns	
C56	TTDE	1456				0,016	0,007	6						0,034	0,016	7					**
C57	Neril acetato	1457							0,015	0,001	5										*
C58	1473	1473				0,013	0,003	6													***
C59	1476	1476							0,015	0,003	5	0,022	0,005	4							***
C60	1527	1527															0,018	0,007	4	*	
C61	β-Bisabolol	1755				0,017	0,008	5													**
C62	1756	1756												0,031	0,018	4					*

Tabla 4. Amplitud de las respuestas antenales (mV) registradas en hembras de *Sirex noctilio* cuando se expusieron a compuestos emitidos por las distintas fuentes volátiles. Los compuestos individuales se enumeran junto con sus respectivos índices de Kovats y una identificación utilizada en todo el manuscrito para facilitar su identificación. Se muestran las medias (\bar{x}) de las respuestas, con sus respectivas desviaciones estándar (Sd) y el número de antenas que mostraron una respuesta (n). También se muestran los valores p del análisis vectorial resultante del NMDS (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$). Las celdas vacías indican ausencia de compuesto en ese tratamiento específico.

El NMDS basado en la amplitud de la respuesta antenal mostró una disposición espacial que revelaba una separación entre las fuentes (Figura 16). El análisis multivariado mostró que había diferencias significativas en las respuestas antenales de las hembras de *S. noctilio* hacia a los COVs emitidos por estas fuentes (perMANOVA: $F_{2,30}=19,929$, $p<0,001$, permutaciones=9999). Además, la comparación multivariante por pares mostró diferencias significativas entre los COVs de todas las respuestas evocadas (Tabla 5).

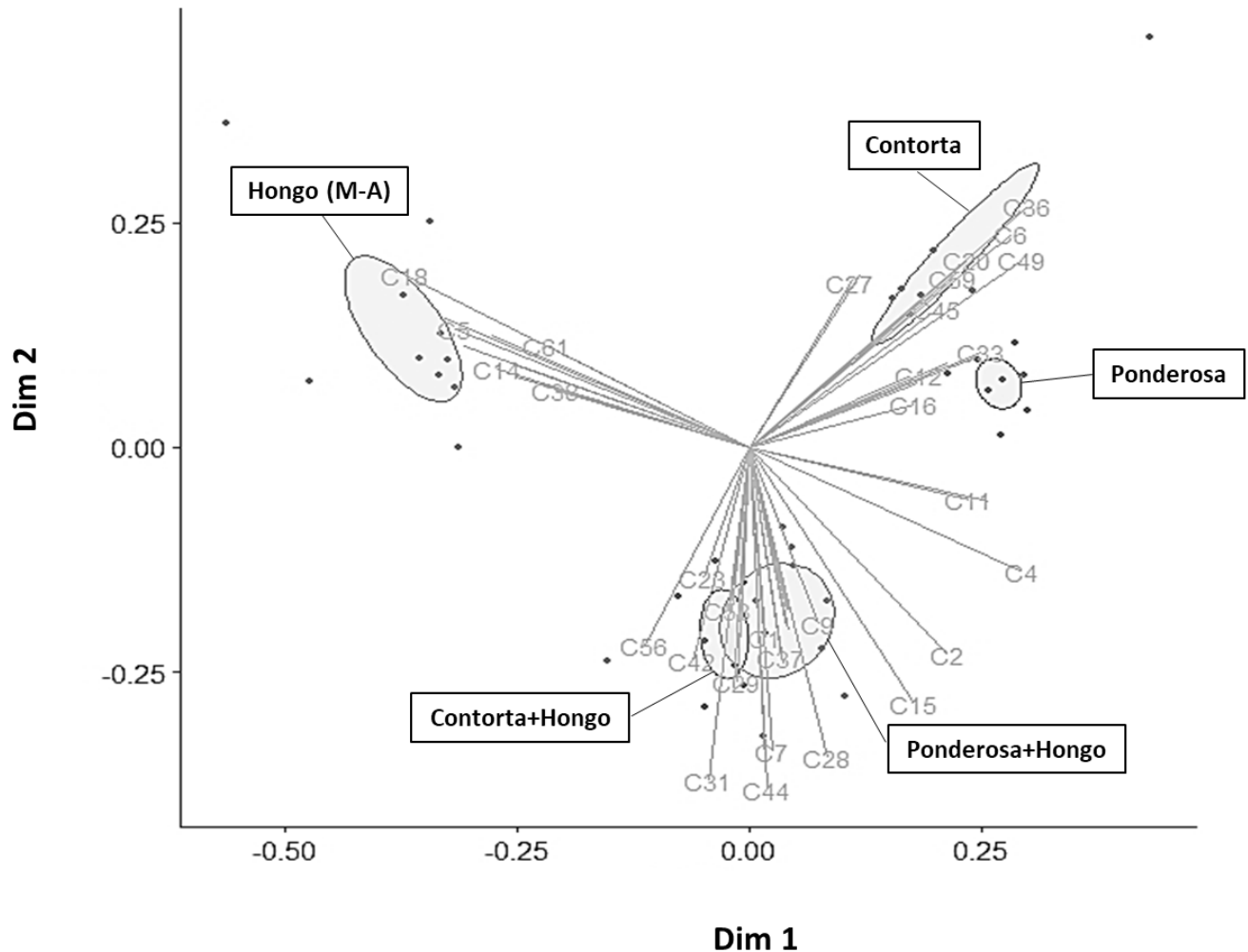


Figura 16. Ordenación por escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basada en las disimilitudes de Bray-Curtis de la amplitud de la respuesta antenal hacia los compuestos orgánicos volátiles de cinco fuentes diferentes: Hongo (M-A) (N=8); Contorta (N=7), Ponderosa (N=8), Contorta+Hongo (N=8) y Ponderosa+Hongo (N=8). Valor de estrés=0,09.

Pares	F-Modelo	r²	p-ajustado
P.contorta+Hongo vs P.contorta	21,48	0.62	0.003*
P.contorta+Hongo vs P.ponderosa+Hongo	9,11	0.38	0.001**
P.contorta+Hongo vs P.ponderosa	31,35	0.69	0.003*
P.contorta+Hongo vs Hongo	21,88	0.58	0.001**
P.contorta vs P.ponderosa+Hongo	17,1	0.55	0.001**
P.contorta vs P.ponderosa	9,88	0.43	0.002*
P.contorta vs Hongo	19,66	0.57	0.002*
P.ponderosa+Hongo vs P.ponderosa	20,74	0.58	0.002*
P.ponderosa+Hongo vs Hongo	19,87	0.54	0.001*
P.ponderosa vs Hongo	28,9	0.64	0.001*

Tabla 5. Comparaciones multivariantes por pares del ANOVA permutacional ("adonis") que muestra las comparaciones de las respuestas de CG-DEA de *Sirex noctilio* entre los cinco estímulos diferentes, calculadas con medidas de disimilitud de Bray-Curtis con ajuste de Bonferroni del valor *p*.

También se estableció la incidencia de los compuestos activos en la distinción de las diferentes fuentes de volátiles. El análisis mostró que 53 de los 58 compuestos contribuyen a la separación de las fuentes (Tabla 4). Por último, se muestra el diagrama de Venn con los compuestos detectados emitidos por cada fuente particular y los compartidos (Figura 17).

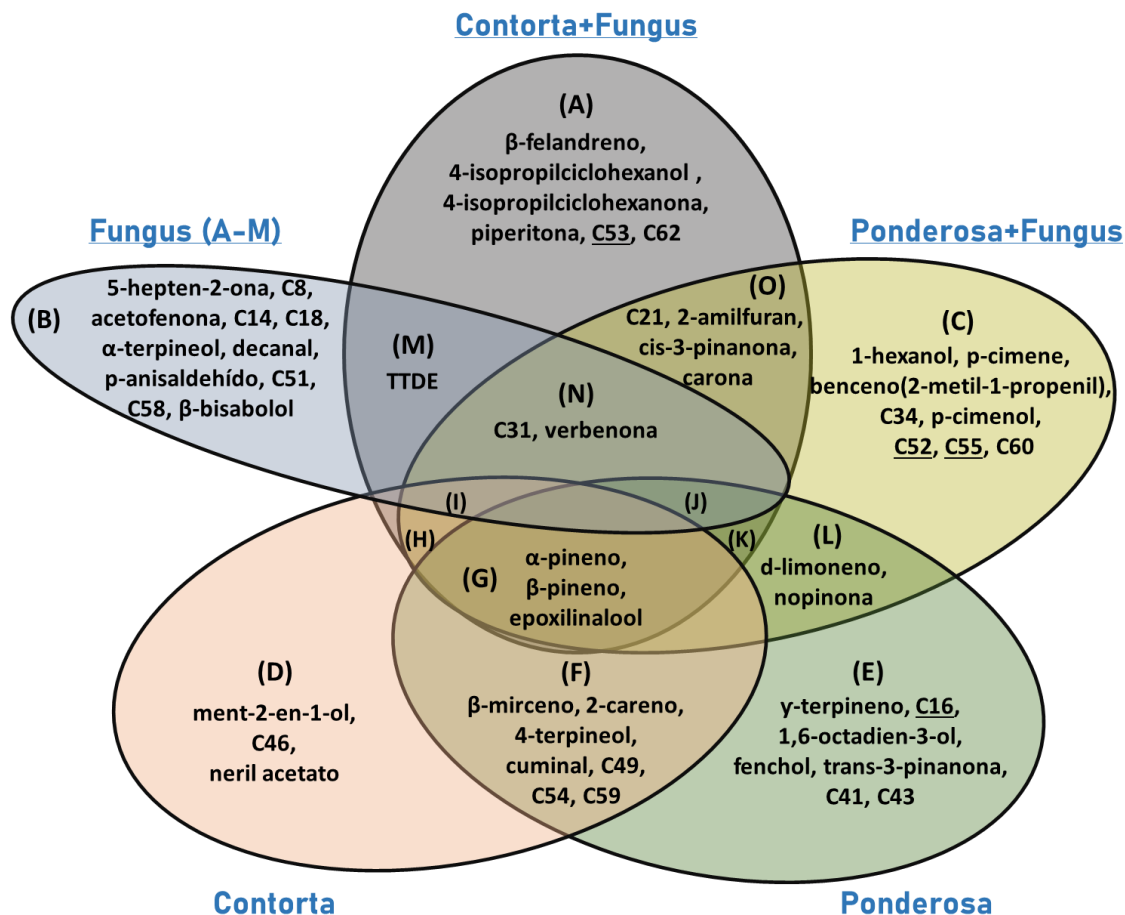


Figura 17. Compuestos volátiles emitidos por cinco fuentes diferentes que desencadenaron respuestas electroantenográficas en hembras de *Sirex noctilio*. Se muestran los compuestos detectados de cada fuente en particular (grupos A-E) y los compartidos por 2 o más (grupos F-O). Se muestran los compuestos estadísticamente significativos y no significativos (subrayados) del análisis de los vectores resultantes de la clasificación NMDS. Para una mejor visualización y comprensión, algunos compuestos no se muestran en la figura: grupo H: 3-careno; I: metilbenzoato; J: estragol; K: C28.

3.4 Discusión

Las respuestas antenales indican que las hembras de *S. noctilio* detectaron una amplia gama de compuestos, con algunas respuestas a volátiles emitidos exclusivamente por una fuente, y otras compartidas por dos o más. Según el análisis NMDS, estas respuestas varían entre las fuentes analizadas, revelando (y confirmando) la capacidad de las hembras para discernir entre ellas (teniendo algunas de estas respuestas más peso que otras).

Los resultados comportamentales mostraron que tanto el hongo como la madera de pino son claramente relevantes para las hembras de *S. noctilio*. Se vio que ambas especies de pino inoculadas con el hongo en crecimiento mostraron ser fuertes atrayentes por sí solas cuando se contrastaron con el aire. Sin embargo, en términos globales, se encontró una clara jerarquía en las preferencias mostradas por las hembras de *S. noctilio*, con el nivel más alto evidenciado hacia los volátiles liberados por el simbionte *A. areolatum* creciendo en *P. contorta*, seguido de *P. contorta* por sí mismo y luego por el hongo creciendo en medio de cultivo artificial. Cabe destacar, nuevamente, que el nivel de preferencia hacia *P. contorta* fue superior al observado para la especie hospedadora alternativa *P. ponderosa*, incluso cuando presentaba crecimiento del simbionte. Es importante destacar que existen múltiples posibilidades acerca de lo que podrían estar percibiendo a nivel sensorial las hembras de *S. noctilio* y qué es en última instancia lo que desencadena las respuestas comportamentales. Sin embargo, se podrían proponer distintos escenarios (o posibilidades) en cuanto a las respuestas observadas y analizar algunos casos particulares.

3.4.1 Diferenciación general entre fuentes y preferencia hacia *p. contorta*

Según el análisis de las respuestas antenales, en términos generales, se podría plantear que la diferenciación entre las fuentes evaluadas por parte de las hembras podría deberse a cualquiera de los compuestos observados a partir de cada una de las 5 fuentes particulares (Figura 17; A, B, C, D y E).

Si nos referimos a la preferencia de las hembras hacia *P. contorta*, existen varios compuestos que podrían estar implicados (Figura 17; Contorta: A, D y M; Ponderosa: C, E y L). Curiosamente, el d-limoneno está presente en ambas fuentes con *P. ponderosa* (con y sin el hongo), de acuerdo con estudios previos de extracciones de

terpenoides de esta especie de pino en particular (Crook et al., 2012), que demostraron además ser tóxico, repelente y tener propiedades fungicidas (R. H. Smith, 1963; Karr & Coats, 1988; Ozaki, 2005; Raffa et al., 2005). En esta línea, Kile & Turnbull (1974) demostraron que el limoneno es un inhibidor del crecimiento del micelio de *A. areolatum* en bioensayos de laboratorio. Teniendo en cuenta que el limoneno sólo se detectó en fuentes de olor de *P. ponderosa*, este compuesto podría estar señalando un posible hospedador "menos adecuado" que restringe el crecimiento del simbionte. Se necesitan más investigaciones para determinar qué compuestos son los responsables de la preferencia de contorta frente a ponderosa.

3.4.2 Olores indicadores de recurso (OIR) y olores de fondo

Como se detalló en la sección anterior, estudios previos han registrado una modificación en las respuestas comportamentales cuando interactúan olores de fondo y OIR (Landolt et al., 1994). Se propuso entonces que, dentro de posible escenario diverso en el cual se pueden ver inmersas las hembras al momento de oviponer, un olor de fondo producido por un potencial hospedador en combinación con las emisiones del hongo simbiótico en crecimiento (OIR) podría aumentar la atracción de las hembras cuando se perciben conjuntamente (Figura 18).

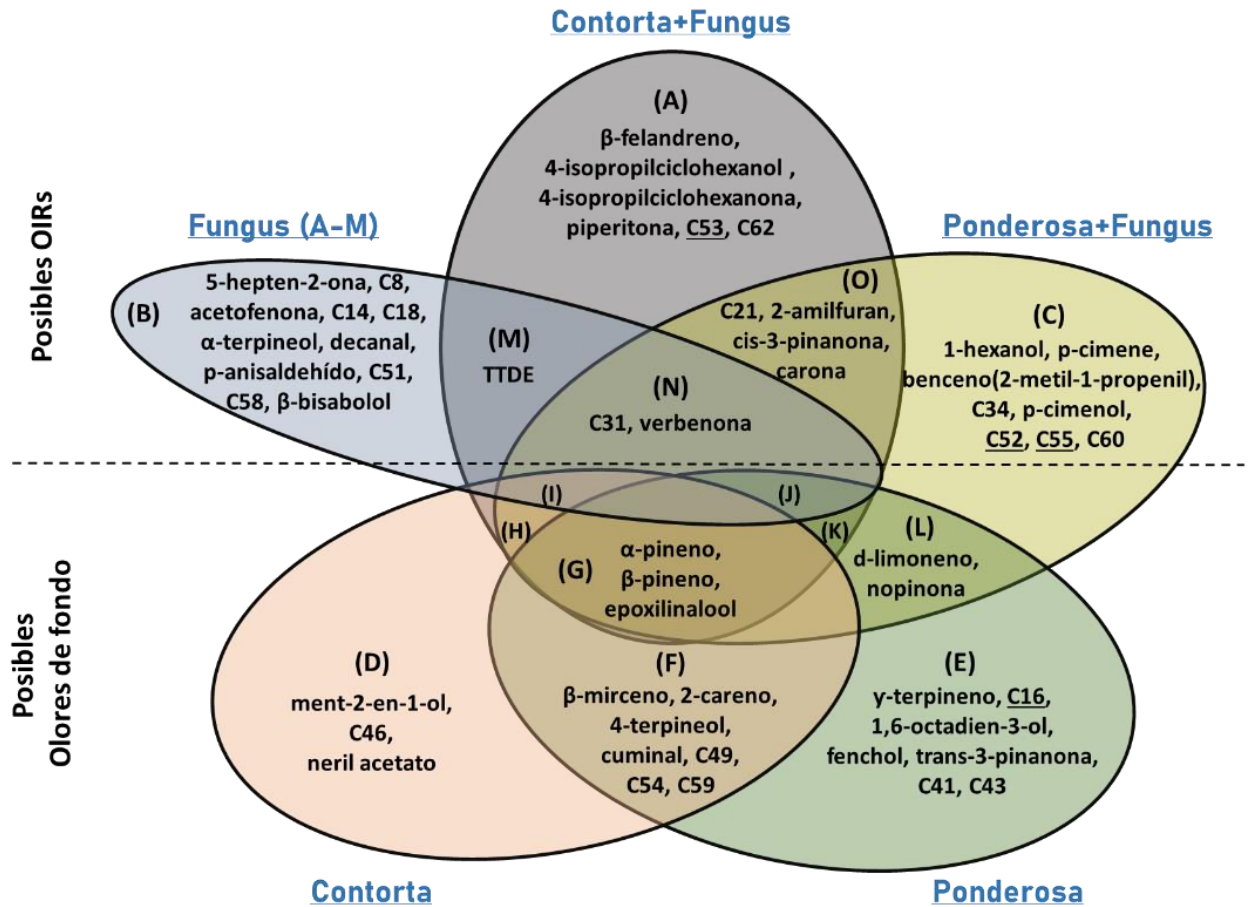


Figura 18. Compuestos volátiles emitidos por cinco fuentes diferentes que desencadenaron respuestas electroantenográficas en hembras de *Sirex noctilio*. Se muestran los compuestos detectados de cada fuente en particular (grupos A-E) y los compartidos por 2 o más (grupos F-O). Se muestran los compuestos estadísticamente significativos y no significativos (subrayados) del análisis de los vectores resultantes de la clasificación NMDS. Para una mejor visualización y comprensión, algunos compuestos no se muestran en la figura: grupo H: 3-careno; I: metilbenzoato; J: estragol; K: C28. Los compuestos situados por debajo de la línea de puntos sugieren posibles olores de fondo, mientras que los situados por encima, posibles olores indicadores de recursos (OIR).

3.4.2.1 Olores de fondo

Las respuestas antenales indican que los compuestos (α pineno, β pineno y epoxilinalool) compartidos por las cuatro fuentes que contienen madera de pino podrían formar parte de los estímulos de fondo. Esto concuerda con estudios anteriores que sugieren que los pinos que emiten α y β pineno evocaron respuestas positivas de las hembras de *S. noctilio* (Erbilgin et al., 2017). Además, estos compuestos forman parte de los atrayentes a base de kairomona que se utilizan actualmente en las trampas panel de intercepción o en las trampas de embudo múltiple

de Lindgren en muchas partes del mundo con fines de control (Corley et al., 2019). Es importante señalar que, en nuestro estudio, los compuestos encontrados en los grupos D, E y F (Figura 18) también podrían ser relevantes como estimulantes de fondo, pero no aparecer en la madera con crecimiento fúngico debido a estar “enmascarados” durante la identificación cromatográfica por algunos compuestos liberados por la madera con hongos en crecimiento. Por ejemplo, compuestos como el β -mirceno, la trans-pinanona y el 4-terpineol, que han demostrado desencadenar respuestas antenales en *S. noctilio* (Simpson, 1976; Simpson & McQuilkin, 1976; Crook et al., 2012), no fueron detectados en nuestro estudio en el grupo G (Figura 18).

3.4.2.2 Olores indicadores de recursos

Nuestros resultados sugieren que los compuestos producidos por fuentes que contienen *A. areolatum* podrían conformar los OIR. En este caso entonces, podrían verse implicados cualquiera de los compuestos emitidos por la fuente más preferida (Figura 18, A). Como la piperitona, por ejemplo, que es una cetona monoterpénica natural que se encuentra en ciertos aceites esenciales y también provocan respuestas antenales en otras especies de insectos (Gabel et al., 1992). Por su parte, el β -felandreno, es un semioquímico conocido hacia el que las hembras de *S. noctilio* mostraron respuesta antenal en estudios anteriores (Simpson, 1976; Simpson & McQuilkin, 1976). En un estudio comparativo de las composiciones de los aceites esenciales de las acículas de las especies de *Pinus* (incluyendo *P. contorta* y *P. ponderosa*), se encontró que el β -felandreno estaba entre los componentes principales de *P. contorta* (Ankney et al., 2022). Otro compuesto de interés es el 2,2,8-trimetiltriciclo[6.2.2.01,6]dodec-5-eno (TTDE), encontrado en emisiones del simbiote creciendo en medio artificial y también cuando crece en *P. contorta* (grupo M), también fue detectado por Jofré et al. (2016), a partir de colectas de volátiles del simbiote.

Los OIR relevantes también podrían ser emitidos por ambas especies de pino con el hongo en crecimiento (Figura 18, O). En este sentido, en estudios relacionados, Kandasamy et al. (2021) demostraron que el crecimiento de los hongos simbióticos de *Ips typographus* sobre la corteza del abeto induce un aumento de las emisiones de monoterpenos oxigenados. Estos incluyen, por ejemplo, al isopinocampone (cis-3-pinanona).

Los autores también informan de que los hongos simbióticos son capaces de convertir una serie de compuestos a partir de los α y β pinenos, muchos de los cuales se encontraron en el presente trabajo (por ejemplo, d-limoneno y el p-cimeno, entre otros) y es posible plantear la hipótesis de que un proceso similar podría resultar de la interacción de *A. areolatum* y la madera de pino. Por lo tanto, en este caso, el simbiote podría no sólo emitir nuevos compuestos por su actividad en la madera, sino también contribuir a la conversión de compuestos ya presentes en la madera. Todo esto demuestra que la clasificación de los compuestos volátiles dentro de esta hipótesis “olores de fondo-OIR”, no siempre es tan clara o estricta, sino que depende de numerosos factores y podría modificarse dependiendo del contexto).

Cabe destacar que determinados compuestos emitidos exclusivamente por el simbiote cultivado en medio artificial (Figura 18, B), también podrían ser relevantes en la definición de los OIR, pero no se registraron cuando el hongo se cultivó en madera. Posiblemente, también debido a estar enmascarados durante la cromatografía por otros compuestos emitidos, por ejemplo, por la fuente Contorta+Hongo. En este sentido, anteriormente se detectó al β -bisabolol en los arrastres volátiles de *A. areolatum* (Wang et al., 2019), mientras que en *S. noctilio* se ha detectado actividad electrofisiológica antenal hacia el p-anisaldehído (Faal et al., 2021).

Finalmente, se pueden describir algunos casos particulares más. Volátiles registrados, como el 3-Careno y la verbenona (Figura 18, H y N), fueron reportados previamente en estudios electrofisiológicos de *S. noctilio* (Simpson, 1976; Simpson & McQuilkin, 1976; Crook et al., 2012). Existen informes que indican que el 3-Careno resultó ser atractivo para las avispas de la madera (Costello et al., 2008; Coyle & Gandhi, 2012). Además, en el aceite esencial de las hojas de *P. ponderosa* predominan (entre otros compuestos) el 3-careno y el estragol (Figura 18, grupo j).

Nuestro estudio es indicativo del mundo químico altamente complejo en el que navegan las hembras de *S. noctilio* para localizar hospedadores adecuados y lugares de oviposición, con interacciones entre diferentes compuestos que parecen ser importantes durante la búsqueda. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que el comportamiento de las hembras está regulado por la madera de pino con signos de ataque previo de congéneres

(es decir, crecimiento fúngico). Además, la especie de pino parece ser clave, maximizándose la atracción cuando el hongo crece sobre *P. contorta*, destacando la sinergia de ambas fuentes de olor. Investigaciones futuras deberían ser apuntadas a establecer la mezcla particular de olores que maximizó la respuesta y en establecer la relevancia de los procesos de aprendizaje durante las primeras etapas de la vida.

Capítulo 4. Respuesta de hembras de *Sirex noctilio* hacia estímulos visuales

4.1 Introducción

4.1.1 La información multimodal en la búsqueda de recursos

En los insectos, el proceso de búsqueda y selección de un huésped o presa suele incluir estrategias multisensoriales. Esta información debe integrarse en el sistema nervioso antes de que el insecto pueda realizar tareas críticas, como localizar a su pareja o evitar a los depredadores. El número de modalidades sensoriales aumenta a medida que un insecto (fitófago, por ejemplo) se acerca y establece contacto con el huésped. Durante la fase de búsqueda a larga distancia, se utiliza la visión, el olfato o una combinación de ambos sistemas para guiar al insecto hacia el recurso. Al entrar en contacto con una planta, la mecanorrecepción y la quimiorrecepción por contacto toman protagonismo como modalidades primarias para la evaluación y aceptación del huésped, aunque la información olfativa sigue siendo muy importante (Schoonhoven et al., 1998). Las modalidades múltiples pueden funcionar simultáneamente, dando lugar a efectos sinérgicos, o secuencialmente en una secuencia fija de respuestas a una sucesión de señales sensoriales procedentes de diferentes modalidades (van Loon & Dicke, 2001). La señalización multimodal es utilizada frecuentemente por las plantas para facilitar la atracción de insectos para la polinización. Las plantas de floración nocturna aplican esta estrategia para atraer a los polinizadores (como la polilla nocturna *Manduca sexta*), donde se requieren señales visuales y olfativa para provocar la extensión de la probóscide y la alimentación (Raguso & Willis, 2002). Más allá de los efectos que puedan provocar estas claves (de distintas modalidades) por separado, existe evidencia acerca de la relevancia que pueden adquirir al presentarse de manera combinada. Es por eso que estos tipos de señales son típicamente utilizadas, por ejemplo, en el desarrollo de trampas atrayentes para el monitoreo o control de insectos (Schmiera et al., 2004). Muchas veces, los ecologistas sensoriales tienden a utilizar un enfoque monomodal cuando investigan los comportamientos mediados por los sentidos en los insectos, pero cada vez hay más estudios que adoptan un enfoque multisensorial. La tendencia hacia los estímulos multimodales debería ser el foco de los futuros estudios.

4.1.2 El uso de la información visual en la búsqueda de recursos

Las capacidades visuales de los animales van desde la simple separación de la luz de la oscuridad, hasta la capacidad de resolver pequeños objetos de diferentes colores en el campo de visión, con gran agudeza. Muchos insectos dependen de una agudeza visual razonablemente buena para orientarse, y sus sistemas visuales están a veces adaptados para resolver tareas formidables. Los insectos y la mayoría de los demás artrópodos utilizan ojos compuestos como sus principales órganos visuales. Además de los ojos compuestos, muchos insectos tienen ojos simples de una sola lente u ocelos, que generalmente no proporcionan una resolución de imagen nítida y cuya función puede variar. Las observaciones de su diseño y los experimentos de comportamiento, sugieren que en algunos insectos voladores los ojos podrían estar adaptados específicamente para funcionar como estabilizadores del vuelo, controlando la posición del horizonte en relación con el animal (Stange et al., 2002).

La función de un ojo es formar una imagen del entorno dividiendo luz entrante según la dirección de origen. Dentro de esta imagen, los objetos individuales se distinguen a través de las diferencias de contraste, en varias posiciones en el campo visual. Las características de la luz que los ojos pueden distinguir y que son importantes en los insectos para la identificación de objetos son: la intensidad, la longitud de onda y el plano de polarización. Los principios físicos del funcionamiento de los sistemas visuales son bien conocidos, lo que facilita las comparaciones entre las predicciones y los resultados experimentales (Land & Nilsson, 2002).

4.1.3 El ojo compuesto

El ojo compuesto, como su nombre lo sugiere, se compone de muchas unidades ópticas individuales. Conocidas como "omatidias", estas unidades tienen forma tubular y constan de una o varias lentes -típicamente una "lente corneal" cuticular externa y transparente; y un "cono cristalino" interno- que suministran luz a un número de células fotorreceptoras (o "células retinulares"), montadas por debajo. Las células pigmentarias primarias y secundarias (con gránulos de pigmento) también están presentes dentro de cada omatidio y envuelven el tubo omatidial. Cada una de las células retinulares posee una región fotosensible de microvellosidades, similar a una varilla, conocida como "rabdómero"; esto contribuye, junto con las de las otras células retinulares del omatidio, a

un "rabdoma" colectivo. El rabdoma (o un rabdómero individual) es una estructura de guía de luz, con pigmentos visuales: opsinas (proteínas de membrana) y cromóforos, que reciben y absorben la luz.

Un rabdoma individual sólo es capaz de discriminar la intensidad media de la luz que forma la imagen. Y debido a que las opsinas particulares residente en el fotorreceptor establecen el rango de longitudes de onda que serán absorbidas con mayor eficiencia, el rabdoma proporciona la información necesaria para determinar el color de esta luz. Cada omatidio señala la intensidad media y el color (y en algunos casos la polarización) de la luz que incide desde la pequeña región del espacio (o campo visual) que ve. La información recibida, es procesada desde la periferia y transportada hacia los centros superiores, en principio principalmente al lóbulo óptico (Burt & Catton, 1956; Strausfeld & Lee, 1991; Labhart & Meyer, 2002; Borst, 2009). De esta manera, las matrices de omatidios juntos crean una visión erguida del mundo, formada como un "mosaico" (Müller, 1826).

El nivel de resolución espacial que puede proporcionar un ojo depende del tamaño de las diferencias angulares de la luz entrante que el ojo puede resolver. Esto, a su vez, depende del espaciado de sus elementos fotorreceptores. La óptica física del ojo también establece un límite superior a la resolución, determinado principalmente por el tamaño del ojo y el diámetro de apertura de sus lentes (Land & Nilsson, 2002). Por lo tanto, los insectos tienen una impresión muy aproximada del mundo visual, y las formas de los objetos que pueden identificar suelen limitarse a los contornos aproximados de, por ejemplo, las flores u hojas. Sin embargo, pueden ser un muy buen complemento de otras claves, como las químicas, para identificar recursos específicos (Dafni et al., 1997).

4.1.4 Visión en color

La capacidad de determinar las longitudes de onda de la luz entrante permite una dimensión totalmente nueva en la distinción de los contrastes en el entorno visual, en comparación con las diferencias de intensidad que ofrece un sistema monocromático (Dafni et al., 1997; Kelber et al., 2003). Estas capacidades pueden ser aún más importantes en un sistema visual que ya tiene dificultades para distinguir las formas debido a una resolución relativamente baja. Aunque la verdadera visión del color sólo se ha verificado experimentalmente en unas pocas

especies (Kelber et al., 2003), la presencia ubicua de fotorreceptores con diferentes especificidades de longitud de onda (según los pigmentos visuales presentes) indica que la mayoría de los insectos la poseen, al igual que los grupos de artrópodos relacionados. Además de ayudar a distinguir los objetos gracias a un mayor contraste, los colores específicos pueden proporcionar por sí mismos información importante sobre los recursos, como las flores o frutos distribuidos entre el follaje verde. Muchos insectos tienen preferencias innatas por ciertos colores relacionados con comportamientos específicos, como la oviposición o la alimentación. Los insectos también pueden aprender los colores y así especializarse rápidamente, por ejemplo, en las flores que proporcionan recompensas de néctar (Schoonhoven et al., 1998; Kelber et al., 2003).

La mayoría de los insectos, incluidas las abejas, la mayor parte de las polillas y los escarabajos, tienen una visión tricromática del color con fotorreceptores de máxima sensibilidad en las partes UV ($\lambda_{\max} \sim 350$ nm), azul ($\lambda_{\max} \sim 440$ nm) y verde del espectro ($\lambda_{\max} \sim 530$ nm). Algunos insectos, incluidas muchas mariposas, tienen un tipo de fotorreceptor adicional sensible a la luz roja ($\lambda_{\max} > 565$ nm), y algunas moscas tienen hasta seis tipos de fotorreceptores diferentes. Los estudios fisiológicos en los Symphyta (moscas de la sierra, avispas de la madera, etc.) han informado de uno a cuatro tipos de fotorreceptores. Los pocos estudios que existen acerca de las capacidades visuales de especies cercanas a *Sirex noctilio*, se han realizado en fotorreceptores de *Urocerus gigas* (Hymenoptera: Siricidae) y *Xiphydria camelus* (Siricoidea Hymenoptera: Xyphidroidae), la misma a la que pertenecen los Sirícidos. Para la primera especie se ha observado un $\lambda_{\max}=542$ y para la segunda, $\lambda_{\max}=556$ y $\lambda_{\max}=604$

4.1.5 La visión en *Sirex noctilio*

Como se introdujo en el primer capítulo de este trabajo, existen escasos estudios acerca de la ecología visual de *S. noctilio*. Sarvary et al. (2014), han evaluado en primer lugar el desempeño de trampas transparentes frente a trampas negras (sin cebos), y estas últimas resultaron en un mayor porcentaje de capturas de hembras en ensayos en túnel de vuelo. En este caso es interesante destacar que más allá de estas diferencias, las capturas obtenidas con trampas sin cebar, son en general, marcadamente bajas (incluso nulas). Luego de realizar este estudio, los

autores realizaron ensayos de doble elección nuevamente en el túnel de vuelo. En este caso, evaluaron trampas claras y negras sin cebar, con cebo químico (kairomonas de *S. noctilio*) y con luz U.V. Las tasas de captura entre las trampas de intercepción transparentes y las negras (sin cebos) no difirieron, pero la adición de una luz ultravioleta aumentó la eficacia de la trampa. Las trampas de intercepción cebadas con luz fueron incluso más atractivas que el señuelo comercial de kairomonas.

En línea con estos estudios, Hurley et al. (2015), demostraron en un estudio de campo que con ambos tipos de trampas (negras y claras) sin cebo químico, se obtenían un número de capturas similares (y muy bajo). Sin embargo, las trampas oscuras con cebo químico aumentaban las capturas mientras que con las trampas claras esto no sucedía.

En el 2019, Allison et al., realizaron ensayos de campo con trampas, para examinar el impacto de los estímulos (principalmente visuales) asociados a los machos de *S. noctilio* en la captura de hembras coetáneas. Los machos de *S. noctilio* forman leks en el dosel superior donde se produce el apareamiento y tiene un segmento abdominal naranja que no está presente en las hembras. Los resultados mostraron que las trampas cebadas con machos muertos (leks simulados) capturaban más hembras que las trampas sin cebar (nuevamente en un número muy bajo). Sin embargo, las trampas cebadas con una mezcla sintética de volátiles del huésped capturaron más hembras de *S. noctilio* que las trampas cebadas con machos muertos. Además, los machos muertos no proporcionaron ningún efecto aditivo en las capturas de las trampas cuando se combinaron con el señuelo volátil del huésped.

Prácticamente todos los estudios realizados hasta aquí, indican que las claves químicas son fundamentales para el funcionamiento de los dispositivos captura para esta especie. En el trabajo de Batista et al. (2018), también queda evidenciada la importancia de los cebos químicos. En este caso, sólo con las trampas cebadas (con compuestos de hospedadores o cebo comercial, por ej. trementina), se obtuvieron capturas. Esto sugiere que las claves visuales podrían ser un buen *complemento* para aumentar la eficiencia y el desempeño de dichas herramientas.

Finalmente, en cuanto a los estudios fisiológicos/moleculares realizados con esta especie, Guignard et al. (2021), intentaron identificar los tipos de fotorreceptores del ojo compuesto, caracterizar los genes de opsina visual de *S. noctilio* y analizar la expresión de ARNm de opsina. Los resultados revelaron dos tipos de fotorreceptores en el ojo compuesto, con sensibilidad máxima a 527 y 364 nm. Además, identificaron tres opsinas en el genoma, homólogas a los genes de opsina verde o sensible a la longitud de onda larga de los himenópteros (LW) LW1, LW2 y sensible al ultravioleta (UV). La ausencia de un gen de opsina homólogo azul o sensible a la longitud de onda corta (SW) y de un receptor correspondiente sugiere que *S. noctilio* es un dicromato verde-ultravioleta.

Como se ha mencionado anteriormente, más allá de los estudios realizados hasta aquí, no existen muchos que hayan logrado encontrar una clave visual que permita (junto a un atrayente químico), maximizar la atracción de las hembras de *S. noctilio*.

4.2 Objetivos

El objetivo de esta sección de trabajo, fue identificar claves visuales que permitan maximizar la atracción de hembras de la avispa *S. noctilio*. Para ello, se analizaron coloraciones de posibles fuentes de información visual relevantes según la ecología de las hembras de *S. noctilio*. Mediante dicho análisis, se seleccionaron los colores comerciales que más se asemejaban a los naturales y se estableció la respuesta a campo de las hembras hacia trampas con dichas coloraciones.

4.2.1 Hipótesis y predicciones

Como se mencionó anteriormente, la información visual suele ser un complemento importante para los insectos en el proceso de satisfacer las necesidades alimentarias, reproductivas y de supervivencia.

Hemos visto que las avispas de *S. noctilio* tienen una evidente preferencia por cierto género particular de plantas (*Pinus*) e incluso podrían presentar preferencias entre distintas especies de este género. Más aún, los árboles estresados (que presentan una sintomatología particular a nivel visual, por ej., clorosis foliar), pueden atraer aún más a las hembras de estos insectos. Finalmente, en cuánto al proceso de búsqueda de conoespecíficos para la

cópula, sabemos que existe un dimorfismo sexual marcado en esta especie, siendo que los machos de las avispas presentan una coloración particular distinta a la de las hembras. En este contexto, se planteó la siguiente hipótesis y predicción:

H2: Existen claves visuales (color de la corteza del pino, acículas cloróticas y abdomen de machos), capaces de maximizar la respuesta de atracción por parte de las hembras de *S. noctilio*.

P2.1: Las hembras de *S. noctilio* serán más atraídas hacia trampas con la coloración particular de (i) la corteza del pino, (ii) acículas cloróticas y (iii) el abdomen de machos, que hacia trampas negras.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Selección de colores

4.3.1.1 Caracterización de colores

En primera instancia se llevó a cabo una caracterización de colores que, según la ecología de estos insectos, podrían estar involucrados en la respuesta de atracción hacia las hembras. Estos colores fueron analizados mediante estudios de reflexión (o reflectancias), un método de análisis comúnmente utilizado en trabajos de ecología visual (Gavini et al., 2019), mediante el cual se determina la fracción de radiación incidente, reflejada por una superficie. Específicamente, un espectro de reflectancias muestra para cada longitud de onda la relación entre la intensidad de la luz reflejada y la luz incidente (Ecuación 1). Esta relación es a la que se denomina reflectancia y se expresa en porcentaje (%) (es medida con respecto a una referencia blanca estándar).

$$\rho(\lambda) = \frac{I. \text{refl}(\lambda)}{I. \text{incid}(\lambda)}$$

Ecuación 1. Ecuación básica de reflectancia, donde $\rho(\lambda)$ es la reflectancia para cada longitud de onda mientras que $I. \text{refl}(\lambda)$ e $I. \text{incid}(\lambda)$ son las intensidades espectrales reflejadas e incidentes (por longitud de onda) respectivamente.

Las superficies analizadas fueron: trozos de corteza de *P. contorta* (especie preferida en ensayos comportamentales y según observaciones en el campo), coloración del abdomen de los machos (dimorfismo

sexual) y acículas cloróticas de pinos (característico de pinos estresados los cuales son más susceptibles a ser atacados por la avispa) (Figura 19). A continuación, se compararon los espectros de emisión de estos objetos con los de una cartilla de colores comercial (60 colores). Se determinó de esta manera, los colores comerciales para ser evaluados en el campo mediante la medición de la eficiencia en capturar hembras de la avispa mediante trampas panel coloreadas y (cebadas).



Figura 19. Objetos utilizados para los análisis de reflectancias. De izquierda a derecha se muestra: corteza de *P. contorta*, acículas cloróticas de *P. contorta* y abdomen de macho de *S. noctilio*. Crédito de la imagen: Masagué. S.

Se utilizaron 4 porciones de corteza de *P. contorta*, 10 muestras de acículas cloróticas de *P. contorta*, 4 abdómenes de machos de *S. noctilio*. Dichas muestras se contrastaron con 60 colores de la cartilla cromática de Pinturas Alba (Argentina) dentro de la gama de colores marrones/naranja. La reflectancia de las muestras mencionadas arriba se analizaron con un espectrómetro Ocean Optics HR4000CG-UV-NIR utilizando una sonda de fibra óptica de reflectancia mixta Ocean Optics QR200-12 conectada a un soporte de sonda negro para excluir la luz ambiental (Figura 20). Todas las medidas fueron tomadas en condiciones de oscuridad. El espectrómetro se acopló a una fuente de luz de xenón continua y se conectó a una PC con el software del espectrómetro OOSpectra Suite. Los datos de reflectancia difusa, de 330-900nm, se generaron en relación con el estándar blanco Ocean Optics WS-1,

y un estándar negro que se tomó apuntando la sonda al aire libre para que no vuelva a dispersarse la luz. Esto también corrige cualquier reflejo interno en el sistema. Se realizó una calibración estándar en blanco y negro antes de cada medida.

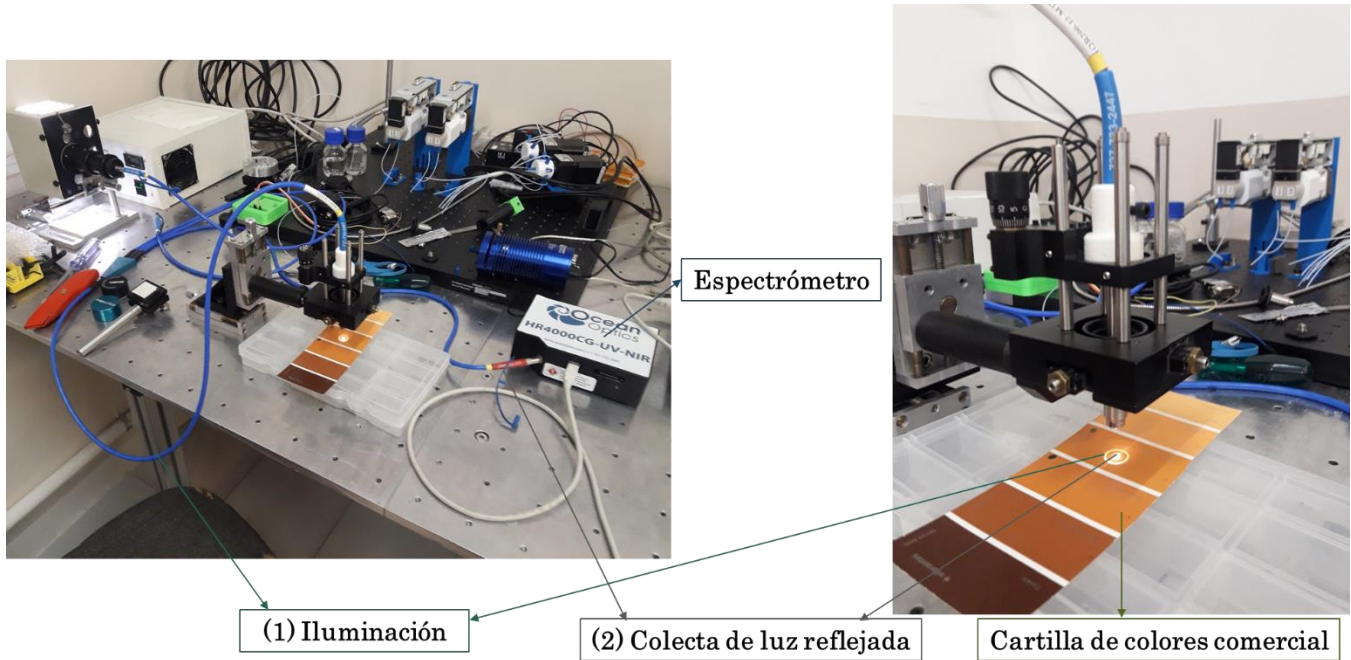


Figura 20. Equipo utilizado para el análisis de reflectancias. Espectrómetro Ocean Optics HR4000CG-UV-NIR con sonda de fibra óptica de reflectancia mixta Ocean Optics QR200-12). El espectrómetro se acopló a una fuente de luz de xenón continua y se conectó a una PC con el software del espectrómetro OOSpectra Suite. Datos de reflectancia difusa, de 330-900nm, se generaron en relación con el estándar blanco Ocean Optics WS-1, y un estándar negro que se tomó apuntando la sonda al aire libre para que no vuelva a dispersarse la luz. Todas las medidas fueron tomadas en condiciones de oscuridad. Crédito de la imagen: Masagüé S.

Para cada objeto analizado se realizaron 5 mediciones de reflexión en diferentes puntos de la superficie de interés y 2 mediciones para cada color comercial. En segundo lugar, se promediaron los espectros para reducir el ruido del espectrómetro, con un período de integración de 600 ms y el rango de longitudes de onda utilizadas fue de 400 a 800 nm.

4.3.1.2 Análisis comparativo entre colores naturales y comerciales

Para el análisis comparativo entre los colores naturales y comerciales, se calculó primero la relación entre los espectros de reflexión de los objetos analizados y los de los colores artificiales. Es decir, a cada espectro de reflexión de cada color proveniente de la cartilla, se lo dividió por la reflexión de las muestras tomadas a partir de los objetos (Ecuación 2). Cabe aclarar que el rango de longitudes de onda utilizadas fue entre 400 y 800 nm. Todos los análisis estadísticos se realizaron con R (versión 3.6-2) (R Core Development Team 2019).

$$R = \frac{\rho(\lambda) \text{ color comercial}}{\rho(\lambda) \text{ objeto analizado}}$$

Ecuación 2. Se muestra el primer cálculo realizado para evaluar la relación entre los espectros de los objetos analizados y los de los colores comerciales. Se dividió el espectro de reflectancias de cada color comercial por el de los objetos analizados. Para recordar el cálculo de reflectancia, ver Ecuación 1.

A continuación, se planteó un modelo lineal para entonces poder evaluar otros parámetros que permitieran seleccionar los colores más parecidos a los objetos analizados (Ecuación 3).

$$\text{Modelo lineal (ml)} = R \sim \lambda_{400-800}$$

Ecuación 3. Se muestra el modelo lineal propuesto para evaluar la relación entre los espectros de los objetos analizados y los de los colores comerciales. Se propuso entonces que la relación, o división, entre las reflectancias de los objetos y de los colores comerciales (R) en función de las longitudes de onda ($\lambda_{400-800}$) debe ajustarse a un modelo lineal. Para recordar el cálculo de reflectancia, y relación entre reflectancias ver Ecuación 1 y Ecuación 2.

4.3.2 Ensayos a campo

4.3.2.1 Experimento 1: Trampeo temporada 2019-2020

Durante el verano de 2019-2020 se instalaron un total de 60 trampas panel cebadas con 40 ml de trementina (Eterna color S.R.L ©). El ensayo contó con 4 niveles del tratamiento (15 trampas/nivel de tratamiento): trampa negra (control), “corteza” (marrones,), “acículas cloróticas” (rojizas) y “abdomen de macho” (amarillas) (Figura 21). Es importante aclarar que también se dispusieron en el campo 15 trampas negras sin cebo para evaluar

específicamente la relevancia de las claves químicas en las capturas. Sin embargo, en ambas temporadas, por una limitante de tiempo y recursos, se decidió no instalar trampas con coloración y sin cebo olfativo.

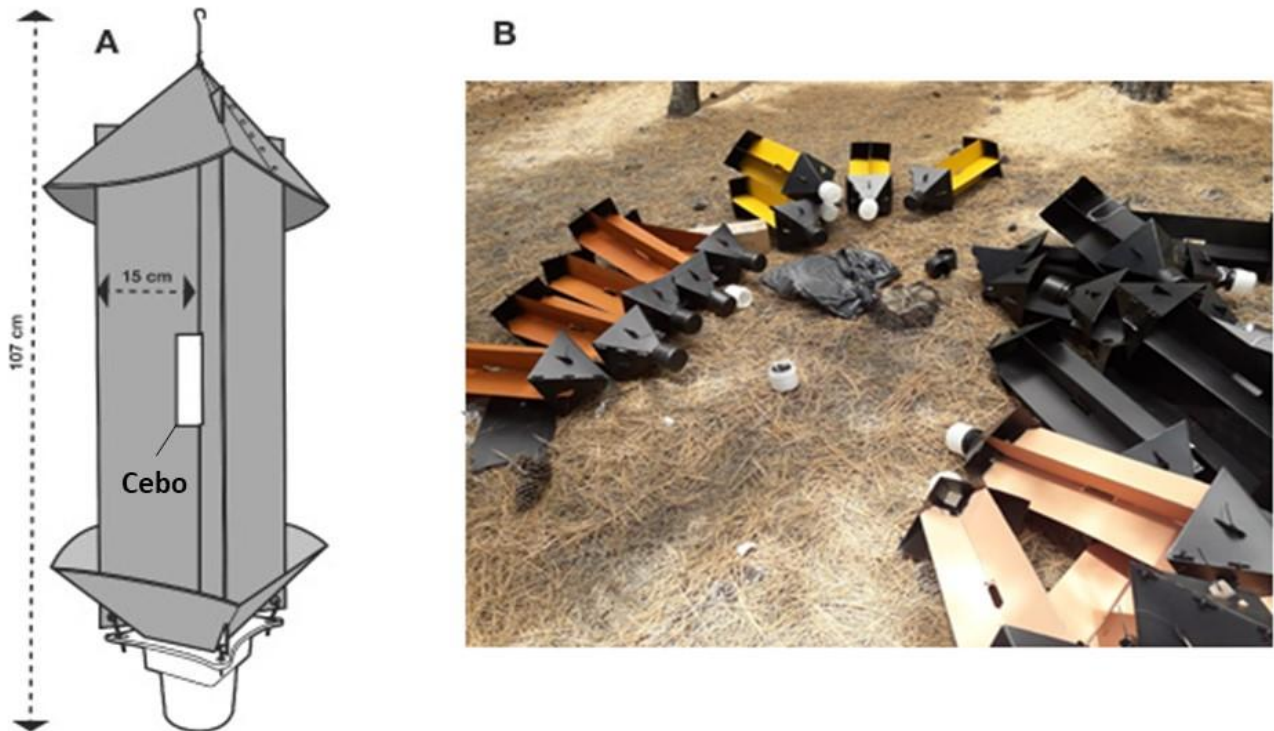


Figura 21. **A**-Trampa panel utilizada para el ensayo a campo, con sus dimensiones aproximadas. Se muestra además la posición del porta-cebo, el cual se conforma a partir de polietileno de 150 micrones sellado herméticamente (10cm x 8cm). **B**-Imagen de las trampas utilizadas en el ensayo con sus respectivos colores ante de ser colocadas en el campo durante la primera temporada de trabajo. Se observan, de izquierda a derecha las coloraciones; corteza, abdomen de macho, negra (control) y acícula clorótica. La sustancia utilizada para cebar las trampas fue la trementina. Es un líquido volátil e incoloro producido mediante la destilación de la resina, o miera de diversas especies coníferas. Está formado principalmente por una mezcla de hidrocarburos terpénicos, mayormente alfa y beta pinenos.

Los ensayos se realizaron en tres plantaciones (5 trampas/nivel de tratamiento/plantación) del norte neuquino, con presencia de *S. noctilio*: 1- "Las Ovejas" (Las ovejas, Prov. Del Neuquén, 36°59'02.8"S, 70°44'03.6"O), 2- "Cajón del huarco" (Prov. Del Neuquén, 37°11'41.172"S, 70°36'20.789"O) y 3- "El llano" (Andacollo, Prov. Del Neuquén, 37°12'50.5"S, 70°36'32.0"O, Figura 22). Las trampas fueron instaladas en el mes de diciembre 2018 (previo a la

temporada de vuelo) y la distancia de separación entre trampas fue de 20mts (cuadrículas de 80 x 80 m). La disposición dentro de la cuadrícula de las trampas fue determinada de manera aleatoria y colgadas de ramas de pino a una altura promedio aproximada desde el suelo hasta el centro de las trampas de 2m. Se realizó la renovación de cebos y se evaluó la presencia de insectos cada 20 días, durante los 3 meses subsiguientes (enero, febrero y marzo).



Figura 22. Ubicación geográfica de las 3 plantaciones donde se realizaron los ensayos de campo con trampas coloreadas (cebadas) durante la primera temporada de trabajo (2018-2019).

4.3.2.2 Experimento 2: temporada 2020-2021

En base a los resultados del ensayo de coloraciones de trampas realizado la temporada 2019-2020, se determinó llevar a cabo un segundo ensayo durante el verano de 2020-2021. Para ello se instalaron un total de 80 trampas panel cebadas con trementina (Eterna color S.R.L ©, misma partida q temporada anterior) de diferentes coloraciones, incluyendo 4 niveles de tratamiento (20 trampas/nivel de tratamiento): i) “negra” (con cebo, control), ii) “corteza oscuro” (c/cebo), iii) “corteza claro” (c/cebo)” y vi) combinación de los 4 anteriores (c/cebo). (Figura 23).



Figura 23. Ejemplos de las coloraciones de las trampas utilizadas en el ensayo con sus respectivos colores. De izquierda a derecha: Negra (control), combinado, corteza oscuro y corteza claro.

Las trampas se dispusieron en dos plantaciones diferentes (10/nivel de tratamiento/plantación) en el paraje “Aucapan” de la comunidad mapuche Linares (Departamento Huiliches, J. de los Andes, Prov. del Neuquén, $39^{\circ}36'1.076''S$, $71^{\circ}03'5.493''O$, y $-39^{\circ}36'6.541''S$, $71^{\circ}03'12.549''O$, Figura 24), donde se observaba ataque de *S. noctilio*. Las trampas fueron instaladas en el mes de diciembre del 2020, bajo el mismo protocolo y respetando los mismos parámetros que en la primera temporada de trabajo. Se realizó la renovación de cebos y evaluó la presencia de insectos 20 días, durante los 3 meses siguientes (enero, febrero y marzo).



Figura 24. Ubicación geográfica donde se realizaron los ensayos de campo con trampas coloreadas (cebadas) durante la segunda temporada de trabajo (2019-2020).

4.3.2.3 Análisis de datos

Para evaluar si el efecto de la coloración de las trampas cebadas en las capturas de hembras de *S. noctilio* se realizó un modelo lineal generalizado con distribución Poisson. Se tomaron "color de la trampa" y "sitio" como efectos fijos en la primera temporada y "color de la trampa" en la segunda temporada (en este caso, el modelo más simple sin el factor "sitio" se ajustó mejor, (menor AIC)). El análisis de datos se llevó a cabo, en cada caso, con el número total de capturas al final de ambas temporadas de trabajo. En primer lugar, debido a que nos interesaba el número final de capturas según el tratamiento y en segundo término ya que en ambos casos el modelo más simple (sin la variable temporal) era el que mejor se ajustaba a nuestros datos.

Cada nivel fue contrastado a posteriori con una prueba de Tukey (en ambos casos, función "glmer" del paquete "lme" para la selección del modelo y función "glht" del paquete "multcomp" para los contrastes). Todos los análisis estadísticos los realicé en el software Rstudio, Version 4.4.1 2021.

4.4 Resultados

4.4.1.1 Análisis de colores

En primera instancia, de modo exploratorio, se calculó el rango de la relación planteada en la Ecuación 2 (o sea, la diferencia entre el valor máximo y el mínimo). A continuación, se intentó encontrar las situaciones en donde las pendientes del modelo lineal (Ecuación 3) fueran cercanas a 0, los residuos fueran mínimos y se observara una relación entre las reflectancias cercanas a 1, Por lo tanto, los casos donde se observaba un mejor ajuste y una menor diferencia fueron los seleccionados (ej., Tabla 6 y Figura 25).

Color comercial comparado	Rango de R	Pendiente del ml	Residuos del ml
cl40	0,85	0,00024	59,184
cl32	0,78	0,00048	58,658
cl8	0,67	0,00054	34,461
cl31	2,55	0,00059	607,614
cl35	0,68	0,00059	35,35
cl26	0,87	0,00061	60,709
cl36	1,09	0,00082	110,515
cl25	0,74	0,00099	43,706
cl52	0,7	0,00099	29,606
cl47	0,7	0,00123	22,083
cl6	0,87	0,00125	46,282
cl41	0,79	0,00138	36,261
cl43	0,75	0,00142	25,878
cl15	0,83	0,00158	35,725
cl27	1,14	0,00158	126,236
cl48	0,89	0,00175	36,56
cl51	0,88	0,00176	31,4

Tabla 6. Ejemplo de colores comerciales (Pinturas Alba, Argentina) cuyas reflectancias fueron comparadas, en este caso, con la reflectancia (promedio) de los abdómenes de machos de *S. noctilio*. Se muestran además los rangos calculados a partir del primer cálculo (división) realizado para la comparación de dichas reflectancias (Ecuación 2). Los colores se ordenaron según las pendientes obtenidas a partir del modelo lineal (ml , Ecuación 3) propuesto (de menor a mayor) y se muestran finalmente los residuos obtenidos a partir de dicho ajuste. Se puede ver (en verde) el color seleccionado como candidato (según nuestro criterio de análisis) como el mejor candidato a ser evaluado en el campo.

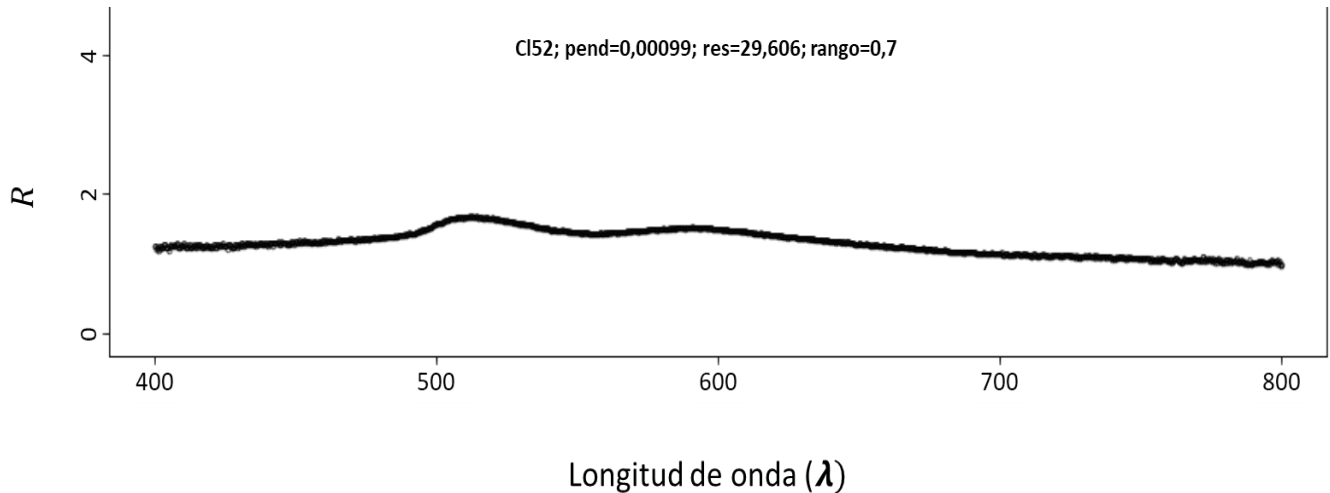


Figura 25. Relación (R) entre la reflectancia del color seleccionado (52) y la del abdomen de los machos de *S. noctilio*. Puede observarse finalmente que la relación entre las reflectancias a lo largo del espectro es muy cercana a 1, algo que también se tuvo en cuenta en la elección del color.

Finalmente, a partir de estos cálculos, se pudieron seleccionar los 3 colores candidatos para ser testeados en el campo en la primera temporada de trabajo y los 2 colores restantes para la segunda temporada de trabajo (Figura 26).

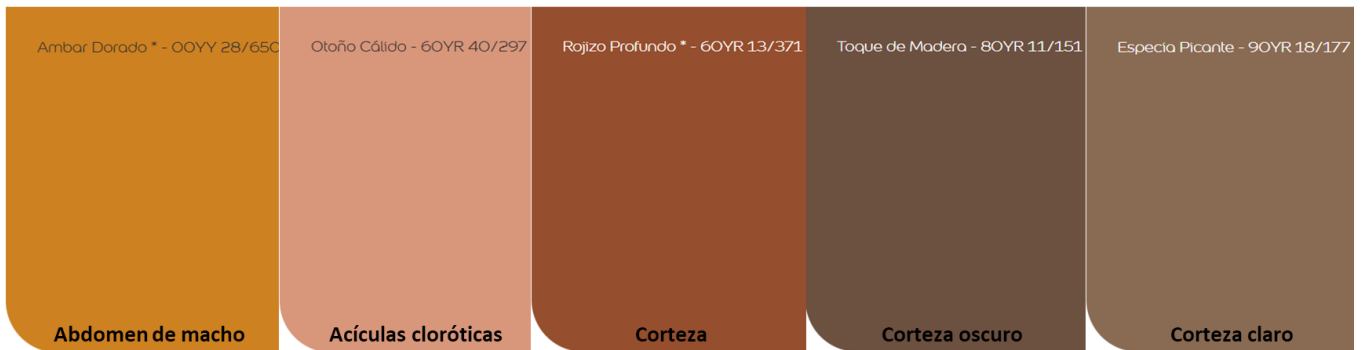


Figura 26. Colores seleccionados para los ensayos de campo. Se muestran, de izquierda a derecha, los 3 colores seleccionados para la primera temporada de trabajo y los 2 colores adicionales utilizados en la segunda temporada. Los colores fueron seleccionados a partir de una cartilla cromática comercial de 60 colores (Pinturas Alba, Argentina) dentro de la gama de colores marrones/naranja. (Imagen tomada del catálogo digital de Pinturas Alba, Argentina).

Finalmente, se colorearon los paneles de las trampas y se realizó nuevamente una medición de las reflectancias sobre para corroborar que los espectros de reflexión no se vieran modificados sobre esta superficie.

4.4.1.2 Experimento 1: Trampeo temporada 2019-2020

Durante el periodo de vuelo de *S. noctilio*, se capturaron en total 114 hembras de *S. noctilio* y ningún macho. En primer lugar, las trampas negras (sin cebo) no capturaron ningún insecto y no se tuvieron en cuenta en el análisis estadístico final. Las trampas negras control (con cebo) capturaron un total de 33 hembras de *S. noctilio*; las “marrones” (corteza), 35 hembras; las “rojizas” (acículas cloróticas), 26 hembras y las “amarillas” (abdomen macho), 20. Al realizar el análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas en cuanto a las capturas entre el control y los demás niveles del tratamiento (Figura 27, control vs corteza, $p=0.995$; control vs acículas cloróticas, $p=0.799$; control vs abdomen macho, $p=0.288$). Sin embargo, como puede observarse, las trampas con color de cortezas obtuvieron un número de capturas similar (y levemente mayor) que las obtenidas con las trampas control. Por lo tanto, la temporada siguiente se decidió continuar explorando en torno a esta coloración.

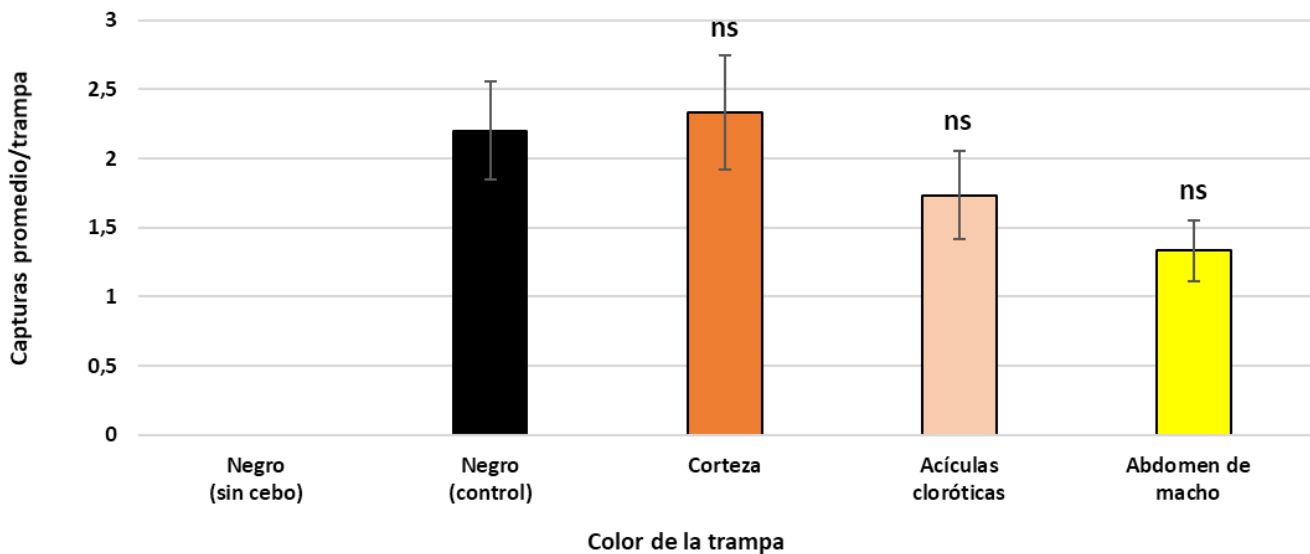


Figura 27. Individuos capturados por trampa en función al color de la trampa durante la temporada 2019-2020. Las letras “ns” indican que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a las capturas según el color de las trampas respecto a las trampas control ($p < 0.05$).

4.4.1.3 Experimento 2: temporada 2020-2021

Se capturaron en total 60 hembras de *S. noctilio* mientras que ningún macho. Las trampas control (negras) capturaron un total de 7 hembras de *S. noctilio*; las “combinadas”, 21 hembras; las “oscuras”, 18 hembras y las

“claras”, 14. Al realizar el análisis estadístico, se observó una clara tendencia a una mayor captura por parte de las trampas de color combinado respecto al control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en cuanto a las capturas entre el control y los demás niveles del tratamiento (Figura 28, control vs combinado, $p=0.055$; control vs corteza oscuro, $p=0.144$; control vs corteza claro, $p=0.434$).

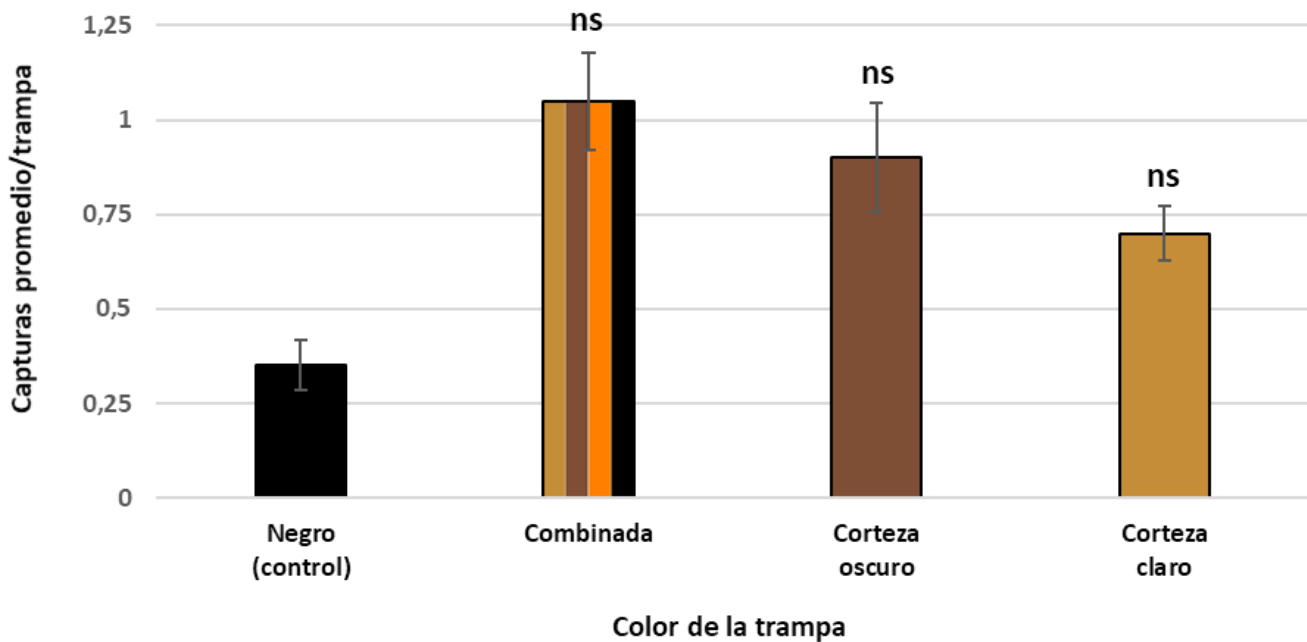


Figura 28. Individuos capturados en función del color de la trampa durante la temporada 2019-2020. Las letras “ns” indican que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a las capturas según el color de las trampas respecto a las trampas control ($p < 0.05$).

4.5 Discusión

Como se ha descrito, el proceso de búsqueda y selección de un huésped o presa en los insectos suele incluir estrategias multisensoriales. Es sabido que, durante la fase de búsqueda a distancia, se utiliza la visión, el olfato o una combinación de ambos sistemas para guiar al insecto hacia el recurso. En este sentido, las hembras de *S. noctilio* podrían utilizar claves de estas naturalezas provenientes de sus hospedadores, particularmente árboles del género *Pinus*. Más aún, teniendo en cuenta la preferencia por árboles estresados, podrían detectar claves que

señalen la presencia de hospedadores debilitados (o más susceptibles) y posiblemente más aptos para el desarrollo de las larvas. Los signos de estrés para el árbol incluyen clorosis foliar y el marchitamiento de las acículas (Coutts, 1969b; Neumann et al., 1987).

Finalmente, si nos referimos al proceso de búsqueda de conespecíficos para la cópula, también se puede destacar que existen numerosos ejemplos en insectos en los cuales las claves químicas y visuales también resultan relevantes (Head et al., 2005; Costanzo & Monteiro, 2007; Rypstra et al., 2009). En este caso, se sabe que, al momento de copular las hembras de *S. noctilio* se verían atraídas hacia cúmulos de machos de la especie. Por lo tanto, resulta coherente pensar que en esta situación también podrían verse implicadas este tipo de claves. El dimorfismo sexual observado para esta especie, es un factor que podría resultar relevante. Tendiendo esto en cuenta, mediante estudios de reflectancia, se caracterizaron colores que según la ecología de *S. noctilio* podían provocar respuestas de atracción por parte de las hembras. Se analizaron los espectros de reflectancia de cortezas de *P. contorta*, acículas cloróticas de esta especie de pino y abdómenes de machos de *S. noctilio*. Luego de contrastar los espectros de emisión de dichas superficies contra 60 colores de una cartilla de colores comercial, se determinó cuáles de estos colores comerciales serían los adecuados y evaluamos en el campo el desempeño de trampas panel (cebadas) con dichas coloraciones.

Al evaluar la eficiencia de captura de las trampas en la primera temporada de trabajo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las trampas coloreadas y las trampas control (negras) comúnmente utilizadas para el monitoreo de la especie. Sin embargo, se observó cierta tendencia por parte de las trampas con la coloración similar a las cortezas, las cuales capturaron un número similar (levemente mayor) al observado con las trampas control.

A partir de los resultados de la primera temporada, se decidió realizar un nuevo ensayo a campo con dos nuevas coloraciones cercanas o similares a la de las cortezas y una combinación de dichas coloraciones más la coloración utilizada en la primera temporada. La trampa con dicha combinación, contaba además con una franja negra sin color. Por lo tanto, se evaluaron distintas coloraciones de manera individual y de manera conjunta. No sólo con la

intención de acercarnos más hacia una posible coloración similar a la de las cortezas, sino también por la posibilidad de que las hembras de *S. noctilio* pudieran detectar algún tipo de contraste (o complementación) entre algunos de los colores evaluados. Incluso la presencia de una franja negra en la trampa, podría acentuar el contraste entre el color de la trampa y las señales visuales de fondo. Existen estudios con insectos donde pudieron verificarse fenómenos como el contraste cromático simultáneo y el contraste cromático sucesivo en los que el tono del objetivo se ve alterado por el color del fondo que lo rodea y por la pre adaptación a un color antes de la prueba, respectivamente (Neumeyer, 1980, 1981; Fukushi, 1989; Kinoshita & Arikawa, 2014). En este sentido, son las propiedades espectrales de los fotorreceptores y los mecanismos neuronales exactos para la comparación de sus señales los que determinan la gama y el tipo de contraste espectral que puede detectarse. De este modo, sutiles diferencias en las propiedades del sistema de visión del color pueden decidir si se pueden detectar o no pequeñas diferencias (Shrestha et al., 2019; Schnaitmann et al., 2020).

Se evaluó entonces el desempeño de las trampas junto a las trampas control. En esta segunda temporada de trabajo se obtuvo una muy baja cantidad de capturas totales de hembras de *S. noctilio*. Y si bien la cantidad observada según los niveles del tratamiento sugerían que claramente existía una diferencia, particularmente entre las trampas con la combinación de colores y el control (21 hembras vs 8 hembras respectivamente). Esta no pudo confirmarse, más allá de haberse obtenido un valor al límite de la significancia estadística.

Los resultados sugieren que trampas con combinación de colores de corteza podrían potenciar la atracción de los insectos hacia las trampas cebadas químicamente. El análisis estadístico no ha mostrado diferencias significativas. Sin embargo, teniendo en cuenta la baja cantidad de insectos capturados, particularmente en la segunda temporada de trabajo. Viendo además el número de capturas totales obtenidos por cada tratamiento y teniendo en cuenta que el análisis en este caso particular resultó prácticamente en una significancia estadística. Creemos que es adecuado proponer al menos que existe un evidente potencial por parte de estas trampas para maximizar las capturas de las hembras de *S. noctilio*. En cuanto a estos resultados, teniendo en cuenta las características del

cebo utilizado (volátiles emitidos por pinos estresados), no resulta sorprendente que esta coloración resultara atractiva, en un contexto posiblemente relacionado con la búsqueda de sitios de oviposición.

Es importante destacar, una de las posibles limitaciones que se presentan al realizar estudios de reflexión como los llevados a cabo en el presente estudio. El dispositivo utilizado para medir la fracción de radiación incidente, reflejada por las superficies analizadas, realiza estas mediciones en áreas altamente específicas y acotadas. Es decir, se mide la luz reflejada de manera muy puntual, ya que el haz de luz utilizado (y reflejado) no permite captar las emisiones de grandes áreas de los objetos, sino de zonas a nivel milimétrico. Es por eso que se realizan promedios de las mediciones realizadas, para finalmente obtener un “espectro general” que represente de mejor manera la luz reflejada por los objetos. Esto resulta aún más complejo para los casos en los cuales no existe un rango particular de longitudes de onda en el cual los objetos reflejen de manera marcada una mayor cantidad de luz (objetos “oscuros” como pueden ser las cortezas analizadas). Por lo tanto, en estos casos, existen finalmente distintos (y diversos) colores comerciales que se asemejan en gran medida a los objetos estudiados. Y aun teniendo en cuenta que quizás algunos de ellos no resulten sustancialmente distintos a partir del sistema de visual de los insectos. Se cree que no sólo podrían existir diferencias en cuanto a la percepción de algunas de esas coloraciones, sino que, además, la suma de algunas de dichas coloraciones por serado (y no el promedio), podrían representar de mejor manera al objeto en estudio. Es por ello que, más allá de no haberse detectado una cantidad de capturas significativamente distinta a las obtenidas por las trampas negras (y con el objetivo de seguir explorando posibles colores atractivos), se propuso continuar explorando coloraciones cercanas a la que mostró un mejor desempeño.

Más allá de los inconvenientes que se presentaron, se propone al menos que existe un potencial por parte de estas trampas para maximizar las capturas de las hembras de *S. noctilio*. Es cierto que no existe evidencia estadística sólida de que esto suceda. Sin embargo, es muy probable que la combinación de colores pueda tener un efecto en el número de capturas. Y es muy probable además que, si el número de capturas totales hubiera sido mayor, estas diferencias se hubieran traducido en diferencias significativas.

Capítulo 5. Respuesta de hembras de *Sirex noctilio* hacia el anisaldehído, volátiles del hospedador y claves visuales.

5.1 Introducción

En los capítulos anteriores, se han descrito los estudios previos y desarrollados hasta aquí acerca de la ecología sensorial de *S. noctilio*. Se ha mencionado la mayor atracción hacia los hospedadores estresados y algunos de los componentes que podrían estar implicados en las respuestas comportamentales de las hembras. Finalmente, se ha resaltado la estrecha relación existente entre *Sirex noctilio* y *Amylostereum areolatum*, lo que resulta en una atracción de las hembras hacia el hongo simbiote. Más aún, se ha explorado el comportamiento y la respuesta antenal de las hembras frente a distintas fuentes con el simbiote en crecimiento, confirmando la relevancia de la presencia del hongo. Sin embargo, más allá de dar luz acerca de las complejas interacciones en este sistema de estudio, el proceso llevado a cabo tiene como objetivo final encontrar algún/os semioquímico/s atrayentes. Estos resultarán ser buenos candidatos para el desarrollo de cebos, que podrían optimizar el funcionamiento de los dispositivos utilizados para el monitoreo de esta especie.

5.1.1 Identificando las señales sensoriales

Un elemento fundamental en el estudio de los sistemas sensoriales es el acceso a estímulos sensoriales relevantes para la experimentación. Hay cuatro pasos igualmente importantes en la identificación y caracterización completa de una señal sensorial:

1. La obtención de la señal natural
2. La selección de los elementos clave de esa señal
3. La síntesis, elaboración u obtención de una nueva señal basada en el paso 2
4. La liberación y exposición de la señal al animal de experimentación, en condiciones en las que se puedan comparar las respuestas a las señales naturales y sintéticas.

El objetivo ideal de este proceso es reproducir una señal que no se distinga, en sus efectos, de la natural. Los problemas que se plantean en las distintas etapas del proceso de identificación son muy diferentes dependiendo de la modalidad sensorial y de la situación específica que se estudie. Un problema general durante todo el proceso es que nuestros propios sentidos difieren de los de los insectos hasta el punto de que a menudo somos incapaces de percibir los elementos clave de la señal, lo que nos obliga a confiar en equipos más o menos sofisticados para identificar los parámetros de la señal (véase Eisner et al., (1969) para un ejemplo clásico). La obtención (o caracterización), el almacenamiento y la emisión de señales auditivas o visuales se ven facilitados en gran medida por las técnicas modernas de grabación, reproducción y síntesis de sonidos e imágenes (Greenfield, 2002). En comparación, las señales químicas son más problemáticas de recoger, almacenar y manejar que los estímulos visuales y auditivos (Millar & Haynes, 1998). Factores como la degradación y la contaminación de los extractos de olores o los sustitutos sintetizados pueden limitar mucho la posibilidad de obtener respuestas fisiológicas y conductuales fiables de los animales de experimentación (Tumlinson et al., 1977; Kozlov et al., 1996).

En este trabajo, se llevó a cabo un proceso similar al planteado anteriormente, con el intento de encontrar señales químicas (y visuales) específicas, que permitan evocar una respuesta de atracción a las hembras de *S. noctilio*. En este caso, se obtuvo uno de los compuestos frente a los que se ha confirmado la respuesta antenal de las hembras. Dicho compuesto fue detectado a partir de la situación “más simple” en la que se encontraba el hongo en crecimiento. Es decir, en el medio de cultivo artificial. El anisaldehído (o 4-anisaldehído o p-anisaldehído), con fórmula química $C_8H_8O_2$, es un compuesto orgánico líquido, transparente y de fuerte aroma que se encuentra comúnmente en fragancias sintéticas y naturales. El compuesto consta de un anillo de benceno sustituido con un aldehído y un grupo metoxi (Figura 29).

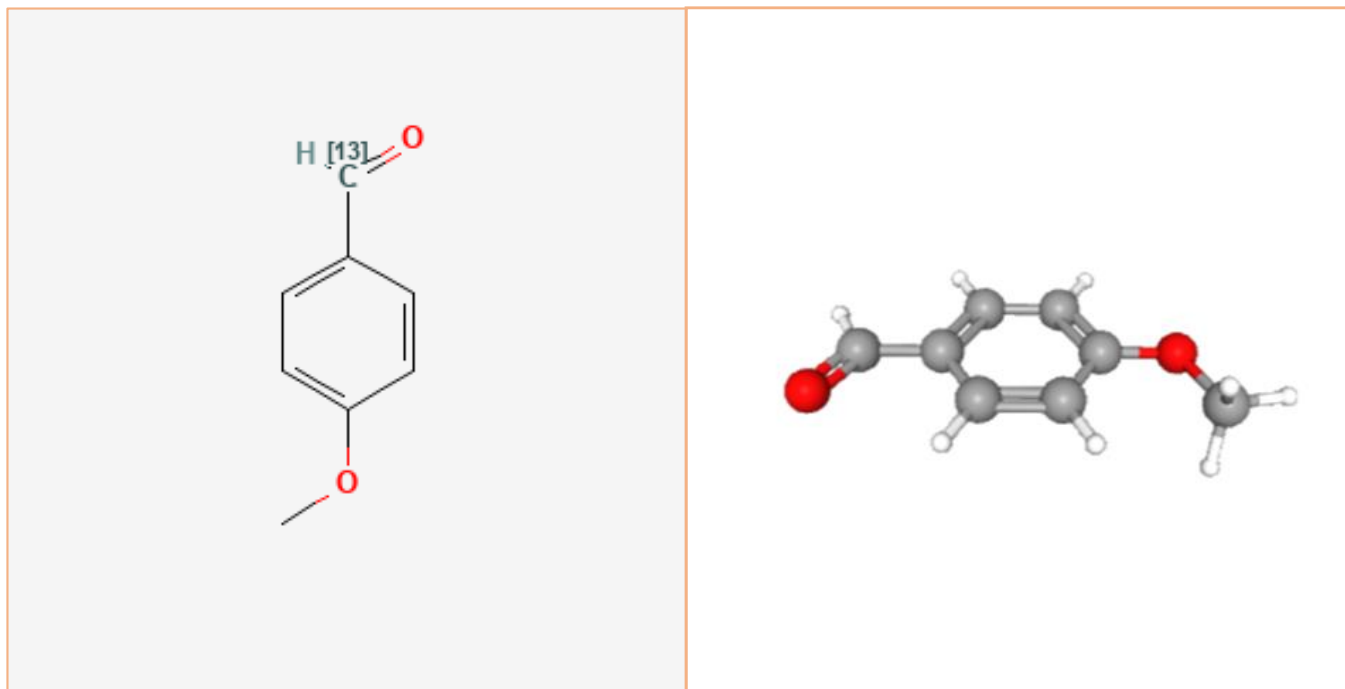


Figura 29. Estructura química del anisaldehído en 2 (a) y 3 (b) dimensiones. Se puede observar el anillo bencénico con el grupo aldehído y el grupo metoxi en la posición 4 (Fuente: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Es importante destacar que el compuesto evaluado fue el único candidato que se encontró disponible comercialmente. Por lo tanto, esta es una de las razones por la cual también se decidió utilizarlo para realizar los estudios.

5.1.2 Objetivos

El objetivo de este capítulo fue estudiar el comportamiento de hembras de *S. noctilio* frente a la combinación de algún/os compuestos y claves visuales específicas identificadas en los capítulos 2, 3 y 4.

En base a los resultados obtenidos hasta aquí, se intentó evaluar en primer lugar un compuesto volátil particular que pudiera resultar en un buen atrayente químico para las hembras de *S. noctilio*. Con este objetivo, se analizaron las preferencias comportamentales de las hembras de *S. noctilio* frente al compuesto candidato (anisaldehído) y a distintas fuentes volátiles relevantes para las hembras. Luego de comprobar el posible potencial de este compuesto como atrayente químico en ensayos de laboratorio, se evaluó la respuesta de las hembras en el campo

hacia distintas combinaciones de claves químicas (anisaldehído y volátiles del hospedador) y visuales relevantes (colores de la corteza de pino).

5.1.3 Hipótesis y predicciones

Teniendo en cuenta las hipótesis planteadas hasta aquí y los objetivos generales de este trabajo, se propuso la siguiente hipótesis particular y predicciones:

H3: Existe algún compuesto emitido por el hongo simbiote capaz de atraer a las hembras de *S. noctilio*, y en conjunto con volátiles del hospedador (y claves visuales particulares) esta atracción se verá potenciada.

P3.1: Las hembras de *S. noctilio* se verán atraídas hacia el anisaldehído (vs Aire) y mostrarán una preferencia hacia dicho compuesto frente a otras fuentes de estímulos relevantes (i.e. hongo en medio artificial, cebo comercial y hongo en madera).

P3.2: Trampas con una coloración particular (colores de la corteza del pino), en combinación con volátiles de hospedador (cebo comercial, i.e. trementina) y volátiles provenientes del hongo (anisaldehído), maximizarán el número de capturas de hembras de *S. noctilio*.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Insectos

Las hembras adultas de *S. noctilio* utilizadas en todos los experimentos se obtuvieron de *Pinus contorta* atacado en el noroeste de la Patagonia, Argentina: Estancia Fortín Chacabuco (Neuquén, 41°0'14.657"S, 71°10'7.775"O) y Comunidad Mapuche Linares (Junín de los Andes, Neuquén, 39°36'3.6"S, 71°3'6.657"O). El proceso de selección y almacenamiento de material hasta la emergencia de los adultos utilizados en los experimentos se encuentra descrito en la Sección 2.2.1.

5.2.2 Confirmación de la respuesta antenal hacia el anisaldehído

Las antenas de las hembras adultas de *S. noctilio* (de 3 ± 2 días de edad) se cortaron con un bisturí y se expusieron a una solución de 1,4 μl del anisaldehído comercial ($\geq 98\%$, © EUMA saiciyf, Argentina) en 20ml de diclorometano ($\geq 99,5\%$, Sintogran®). La dilución realizada (con una concentración de $7,84 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$), resultó adecuada para el análisis antenal mediante el dispositivo utilizado. Todas las antenas utilizadas en cada ensayo ($n=4$) se extrajeron de diferentes hembras y se utilizaron una vez. El dispositivo y protocolo utilizado para la medición de la respuesta antenal se encuentra descrito en la Sección 3.2.3 (página 66). Por cuestiones logísticas y de tiempos no se logró realizar la correspondiente curva dosis-respuesta.

5.2.3 Confirmación de la identidad del compuesto (CG-EM)

Se analizó una muestra del anisaldehído adquirido ($\geq 98\%$, © EUMA saiciyf, Argentina) con el mismo dispositivo y mediante el mismo protocolo utilizado en la Sección 3.2.4 (página 69). Para dicho análisis se utilizó una solución de 1,4 μl de anisaldehído en 10ml de diclorometano ($1,568 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$).

5.2.3.1 Análisis de datos

El anisaldehído se identificó por "matching" computacional ($>95\%$) con nuestra propia biblioteca de espectros de masas y una comparación del índice de retención de Kovats y el espectro del compuesto con datos publicados (Adams, 2007) y bases de datos de la web, (<https://www.pherobase.com/>, <https://webbook.nist.gov/> y <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). La adquisición de datos se realizó con el software de adquisición de datos MassHunter (versión B.06.00, Agilent Technologies, Inc.). Finalmente, se constató que el compuesto (tiempo de retención, Kovats, espectro) coincidiera con el encontrado en las muestras de hongo en medio artificial.

5.2.4 Ensayos de olfatometría en el laboratorio

5.2.4.1 Olfatómetro

Para probar la respuesta comportamental de las hembras de *S. noctilio* hacia los estímulos olfativos, se utilizó el mismo dispositivo (olfatómetro de cuatro vías) descrito en la Sección 2.2.2 (página 48).

5.2.4.2 Fuentes volátiles

Se evaluó en olfatómetro el comportamiento de hembras de *S. noctilio* frente a 5 fuentes de volátiles: (i) Aire limpio (Aire), (ii) anisaldehído (Anisaldehído), (iii) *A. areolatum* crecido en medio de cultivo artificial [Hongo (M-A)], (iv) Trementina y (v) *A. areolatum* cultivado en *P. contorta* (Contorta+Hongo). La fuente (i) consistió en cámaras de olores del olfatómetro vacías. La fuente (ii) consistió en una solución creada a partir de 5µl de anisaldehído puro en 20ml de diclorometano ($2,8 \times 10^{-4}$ g/cm³). La fuente (iii) consistió en un medio de cultivo estéril de agar, malta y levadura (Martínez et al. 2006). Se inocularon en el medio artificial fragmentos de hifas extraídos de micangias de hembras de *S. noctilio* y el hongo se dejó crecer a 22 ± 1 °C y $65 \pm 5\%$ de HR en la oscuridad hasta que toda la superficie del disco de madera estuvo cubierta de micelio (18 ± 3 días). La fuente (iv) consistió en un papel filtro (1,5x2cm) con 4µl de una solución creada a partir de 5µl de trementina (Eterna color S.R.L ©) en 20ml de diclorometano. La fuente (v) se obtuvo mediante la tala de pinos de *P. contorta* (10 cm de diámetro a la altura del pecho). Una vez talados, se cortó una porción del tronco en discos (1 cm de grosor). A continuación, se inocularon fragmentos de hifas de *A. areolatum* procedentes de hembras de *S. noctilio* (ver fuente iii) en discos de *P. contorta*. El hongo se dejó crecer a 22 ± 1 °C y $65 \pm 5\%$ de HR en la oscuridad hasta que toda la superficie del disco de madera estuvo cubierta de micelio (18 ± 3 días).

5.2.4.3 Ensayos comportamentales

Dos horas antes de los experimentos, las avispas hembras se trasladaron de la incubadora a una sala de aclimatación con luz artificial, 24 ± 1 °C y 65 ± 5 % HR. Se introdujo una sola avispa en la zona central del

olfatómetro. Una vez liberada, se le dio 2 minutos para que se aclimatara dentro del olfatómetro. Tras este periodo, se grabó el movimiento de la avispa con una webcam centrada a 150 cm por encima del olfatómetro (Facecam 1000 Genius,) a 5 fotogramas/s durante 10 min. Todos los bioensayos se realizaron en condiciones controladas (24 ± 1 °C de temperatura y 65 ± 10 % HR). En cada ensayo, se probaron 28 hembras adultas de *S. noctilio*. El olfatómetro se utilizó en dos sentidos, ya que se presentaron dos fuentes de estímulos volátiles simultáneamente a las avispas individuales en cada réplica (Tabla 7). Así, en cada ensayo, dos ramas del olfatómetro contenían la misma fuente de volátiles y las otras dos contenían una fuente diferente. Las mismas fuentes de volátiles se colocaron siempre en brazos adyacentes y sus posiciones se rotaron según un esquema predefinido cada dos ensayos para minimizar los sesgos de orientación. Cuando se utilizó madera o medio de cultivo artificial con hongo como fuentes volátiles (fuentes iii y v), se introdujo una porción rectangular (2,5 cm x 1 cm x 1 cm) de la fuente en cada cámara. Cuando se utilizaron las soluciones de anisaldehído o trementina en diclorometano como fuentes volátiles (fuentes ii y iv), se introdujo una porción rectangular de papel de filtro (2,5 cm x 1 cm x 1 cm) con 4µl de la solución en cada cámara. Al contrastar la respuesta hacia el aire, se dejaron vacías dos cámaras adyacentes. Después de cada réplica, se renovaron las fuentes volátiles y las cámaras de arena y de olor se enjuagaron a fondo con agua, alcohol y hexano. Además, se realizó un control: diclorometano vs. Aire.

Estímulo 1 \ Estímulo 2	Aire	Hongo (M-A)	Trementina	Contorta+Hongo
Anisaldehído				

Tabla 7. Combinaciones por pares de 5 fuentes de olor presentadas a una hembra de *Sirex noctilio* en el olfatómetro durante bioensayos de 10 minutos de duración. Los ensayos de control (*aire vs. aire* y *medio de cultivo artificial (M-A) vs. aire*) no se muestran en la tabla por motivos de claridad.

5.2.4.3.1 Cantidades de compuestos utilizadas

A partir de un análisis comparativo entre el área obtenida a partir del estudio cromatográfico de la solución de anisaldehído en diclorometano (Figura 32, a) y las áreas obtenidas a partir de 3 muestras de volátiles colectados de 3 placas de Petri con hongo en medio de cultivo artificial (durante 24hs, bajo las mismas condiciones y mediante

protocolos utilizados en todas las colectas descritas hasta aquí). Se pudo determinar que la cantidad de anisaldehído utilizada en los ensayos comportamentales (4ul de la solución de anisaldehído en diclorometano), se encuentra aproximadamente dentro de las mismas unidades que las presentes en el hongo en medio de cultivo artificial (y en madera) utilizadas para los ensayos (cálculos no mostrados).

5.2.4.4 *Análisis de los datos de olfatometría*

El método de análisis de los resultados obtenidos a partir de los ensayos comportamentales en el olfatómetro, se encuentra descrito en la Sección 2.2.5 (página 51)

5.2.5 *Ensayos de trampeo a campo*

Durante el verano de 2021-2022 se instalaron un total de 126 trampas panel. El ensayo contó con 6 niveles de tratamiento (21 trampas/nivel de tratamiento): trampa negra (cebada con trementina), trampa con coloración combinada (Cap. 4) (cebada con trementina), trampa negra (cebada con anisaldehído), trampa con coloración combinada (cebada con anisaldehído), trampa negra (cebada con trementina y anisaldehído), trampa con coloración combinada (cebada con trementina y anisaldehído), Los cebos con trementina contaban con 40ml de dicho compuesto en porta-cebos de polietileno de 150 micrones sellado herméticamente, mientras que los de anisaldehído contaban con 10 ml en porta-cebos de polietileno de 80 micrones (10cm x 8cm). Esto último se decidió luego de calcular la tasa de evaporación de este último compuesto.

Las trampas se dispusieron en tres plantaciones diferentes (7/nivel de tratamiento/plantación). Dos de ellas en la Estancia Fortín Chacabuco (Neuquén, 41°0'14.657"S, 71°10'7.775"O) y una en el paraje "Aucapan" de la Comunidad Mapuche Linares (Junín de los Andes, Neuquén, 39°36'3.6"S, 71°3'6.657"O, Figura 30). En todas ellas se observaba ataque de *S. noctilio*. Las trampas fueron instaladas en el mes de diciembre del 2021 (previo a la temporada de vuelo) y la distancia de separación entre trampas fue de 20mts (cuadrículas de 80 x 80 m). La disposición dentro de la cuadrícula de las trampas fue determinada de manera aleatoria y colgadas de ramas de pino a una altura promedio aproximada desde el suelo hasta el centro de las trampas de 2m. Se realizó la

renovación de cebos y se evaluó la presencia de insectos cada 20 días, durante los 3 meses subsiguientes (enero, febrero y marzo).

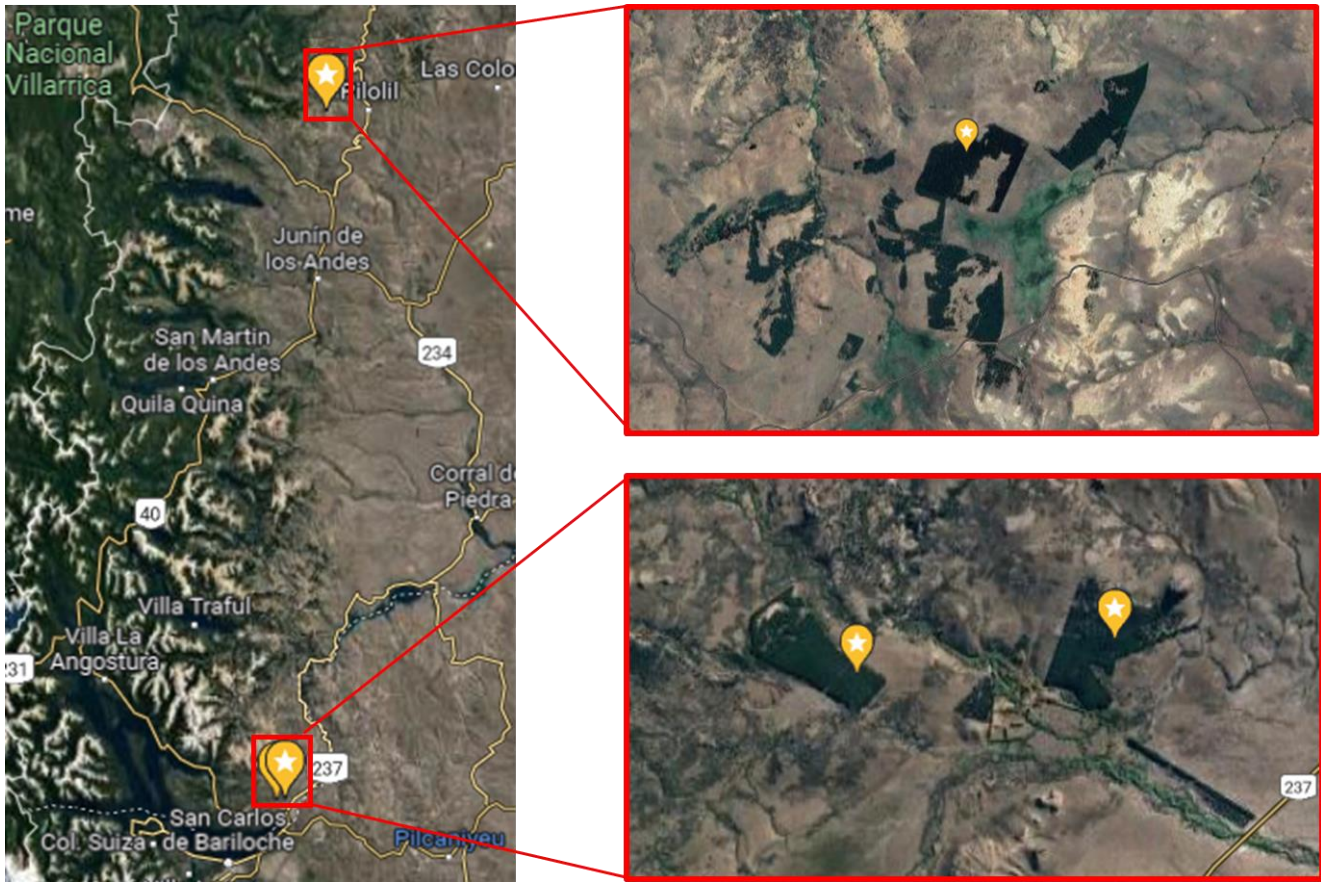


Figura 30. Ubicación geográfica de las 3 plantaciones donde se realizaron los ensayos de campo con trampas durante la temporada de trabajo 2021-2022.

5.2.5.1 Análisis de datos

Para evaluar si el efecto de la coloración de las trampas cebadas en las capturas de hembras de *S. noctilio* se realizó un modelo lineal generalizado con distribución Poisson. Se tomó "color de la trampa" como efecto fijo. El análisis de datos se llevó a cabo con el número total de capturas al final de la temporada de trabajo. En primer lugar, debido a que nos interesaba el número final de capturas según el tratamiento y en segundo término ya que en ambos casos el modelo más simple (sin la variable temporal) era el que mejor se ajustaba a nuestros datos. Todos los análisis estadísticos los realicé en el software Rstudio, Version 4.4.1 2021.

5.3 Resultados

5.3.1 Estudios confirmatorios con el anisaldehído

5.3.1.1 Respuesta antenal frente al anisaldehído puro

Mediante el análisis realizado, se pudo comprobar la respuesta antenal de las hembras hacia el anisaldehído (Figura 31).

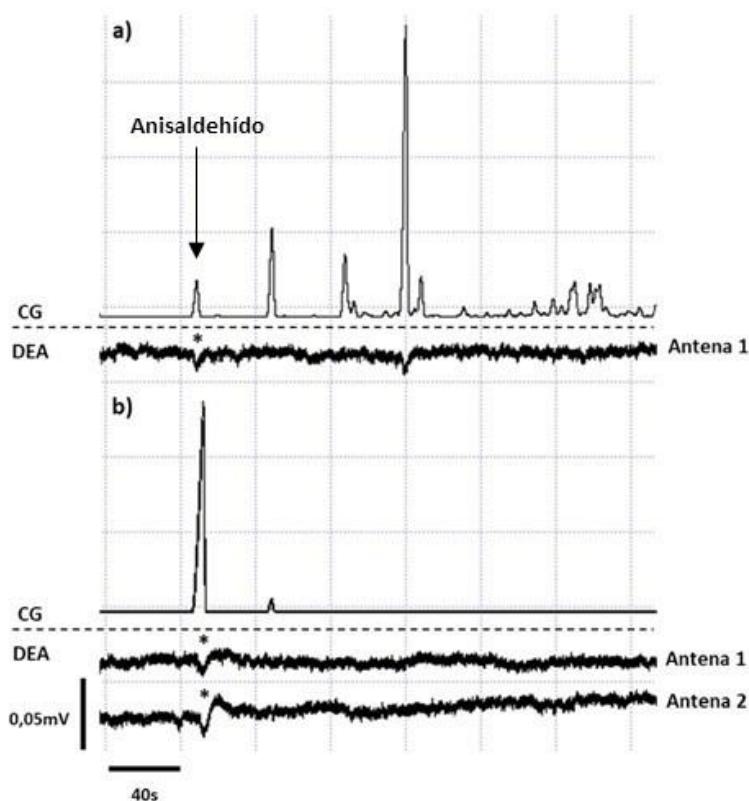


Figura 31. Ejemplo de una salida de CG-DEA. a), Arriba (CG), los compuestos emitidos por el hongo en medio de cultivo artificial. a) abajo (DEA), se señala con un asterisco la respuesta de una antena hacia el anisaldehído. b) arriba (CG), se muestra la salida del anisaldehído comercial adquirido. b) abajo (DEA), se señala con asteriscos la respuesta de dos antenas hacia el compuesto.

5.3.1.2 Confirmación del compuesto mediante cromatografía gaseosa y espectrometría de masas

A partir de los estudios de cromatografía gaseosa/espectrometría de masas y mediante nuestra biblioteca de compuestos personal, se pudo corroborar que el compuesto adquirido se trata efectivamente de anisaldehído

puro y que el detectado a partir del hongo en crecimiento en medio de cultivo artificial también se trataría de dicho compuesto (Figura 32).

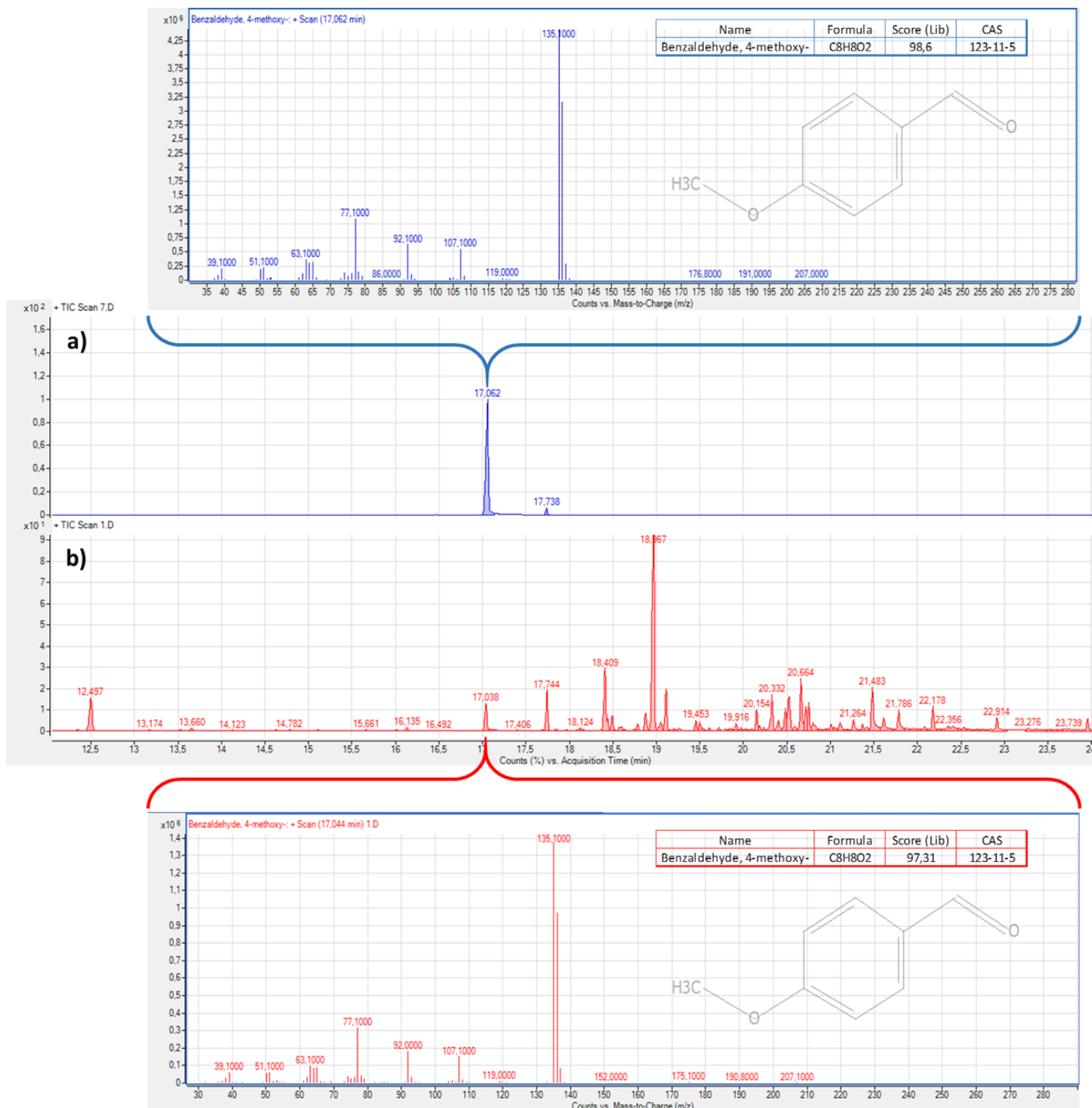


Figura 32. Se muestran salidas directas del análisis de datos obtenidos a partir de los estudios de cromatografía gaseosa y espectrometría de masas. Se muestran las salidas de: a) El anisaldehído comercial adquirido (azul) y en la parte superior (a partir de la llave azul) su espectro de masas particular junto al resultado de la identificación del compuesto (tabla azul) mediante nuestra librería personal. b) Los compuestos detectados a partir de la fuente con hongo en crecimiento en medio de cultivo artificial (rojo). En este caso se detectó y analizó específicamente el anisaldehído. Se muestra en la parte inferior (a partir de la llave roja) su espectro de masas particular junto al resultado de la identificación del compuesto (tabla azul) mediante nuestra librería personal. Se puede observar el alto grado de emparejamiento (“matching”) computacional obtenido (scores >95%) y la confirmación de que se trata del mismo compuesto.

5.3.2 Respuesta en olfatómetro

En primer lugar, se realizó un control para verificar que el diclorometano (solvente utilizado para la dilución del anisaldehído y trementina), no afectaba el comportamiento de las hembras, en el cual no se observaron diferencias significativas (n=28, $\chi^2=0,41$, p=0,5228, no mostrado). Al contrastar al anisaldehído con aire puro, se observó una preferencia comportamental por parte de las hembras hacia el compuesto sintético (n=28, $\chi^2=18,57$, p<0,0001) (Figura 33). La misma preferencia comportamental se observó al contrastar a este compuesto con el hongo en medio de cultivo artificial (n=28, $\chi^2=16,78$, p<0,0001). Luego de confirmar la atracción de las hembras hacia la trementina (n=28, $\chi^2 = 7,39$, p<0,01), se observó que las hembras prefirieron al anisaldehído frente a este compuesto (n=28, $\chi^2 = 12,30$, p=0,0005). Finalmente, al contrastar al anisaldehído con la fuente que resultó se la preferida en el capítulo 2 (Contorta+Hongo), no se observaron diferencias significativas (n=28, $\chi^2=2,08$, p=0,1493).

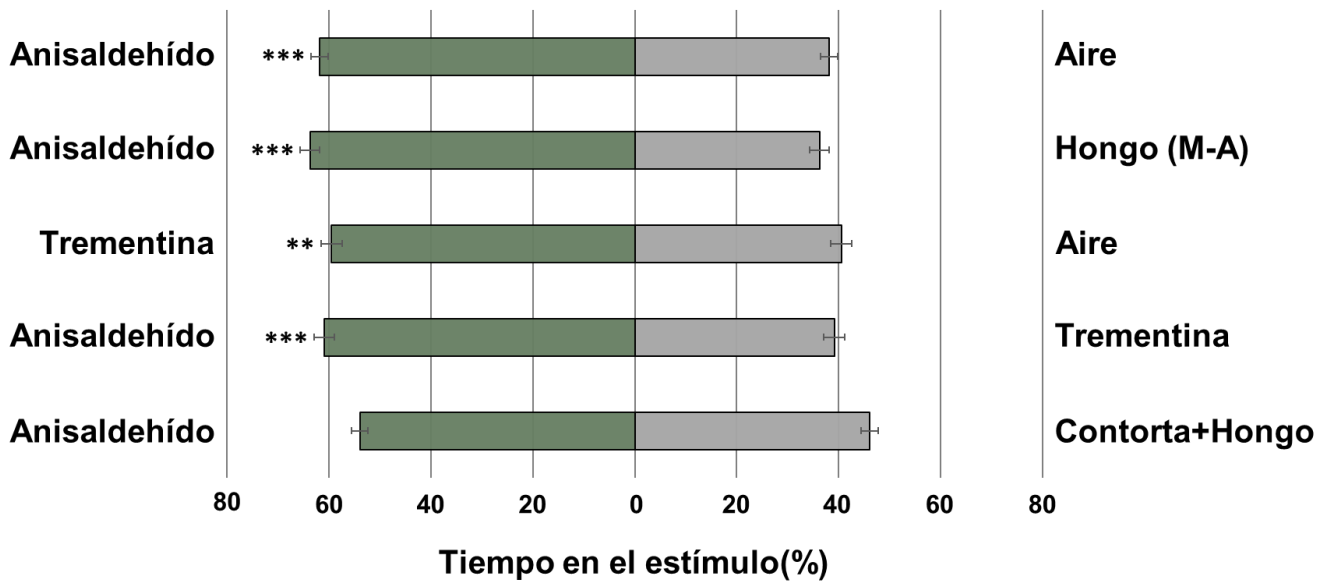


Figura 33. Respuestas comportamentales de las hembras de *Sirex noctilio* en un olfatómetro hacia combinaciones de aire limpio (Aire), anisaldehído, hongo cultivado en medio de cultivo artificial (Hongo (M-A), trementina y hongo cultivado en madera de *P. contorta* (Contorta+Hongo) (n=28 hembras). Los estímulos utilizados en las combinaciones de a pares, se detallan a la derecha y a la izquierda de la figura. Las barras representan la media (\pm error estándar) del porcentaje de tiempo permanecido en la zona correspondiente al estímulo. Los resultados significativos se indican con asteriscos (**:p<0,01, ***:p<0,001) mientras que los contrastes no significativos (P>0.05) no se indican.

5.3.3 Ensayo de campo (2021-2022)

Durante el periodo de vuelo de *S. noctilio*, se capturaron un total de 12 hembras de *S. noctilio* y ningún macho. Las trampas negras (cebadas con trementina) capturaron un total de 2 hembras; las trampas con coloración combinada (cebadas con trementina), 2 hembras; las trampas negras (cebadas con anisaldehído), 2 hembras; las trampas con coloración combinada (cebadas con anisaldehído), 2 hembras; las trampas negras (cebadas con trementina y anisaldehído), 2 hembras y las trampas con coloración combinada (cebada con trementina y anisaldehído), 3 hembras. Al realizar el análisis estadístico, como era de esperar debido además al bajo número de capturas, no se observaron diferencias significativas en cuanto a las capturas entre los tratamientos (Figura 34, $p=0.9587$).

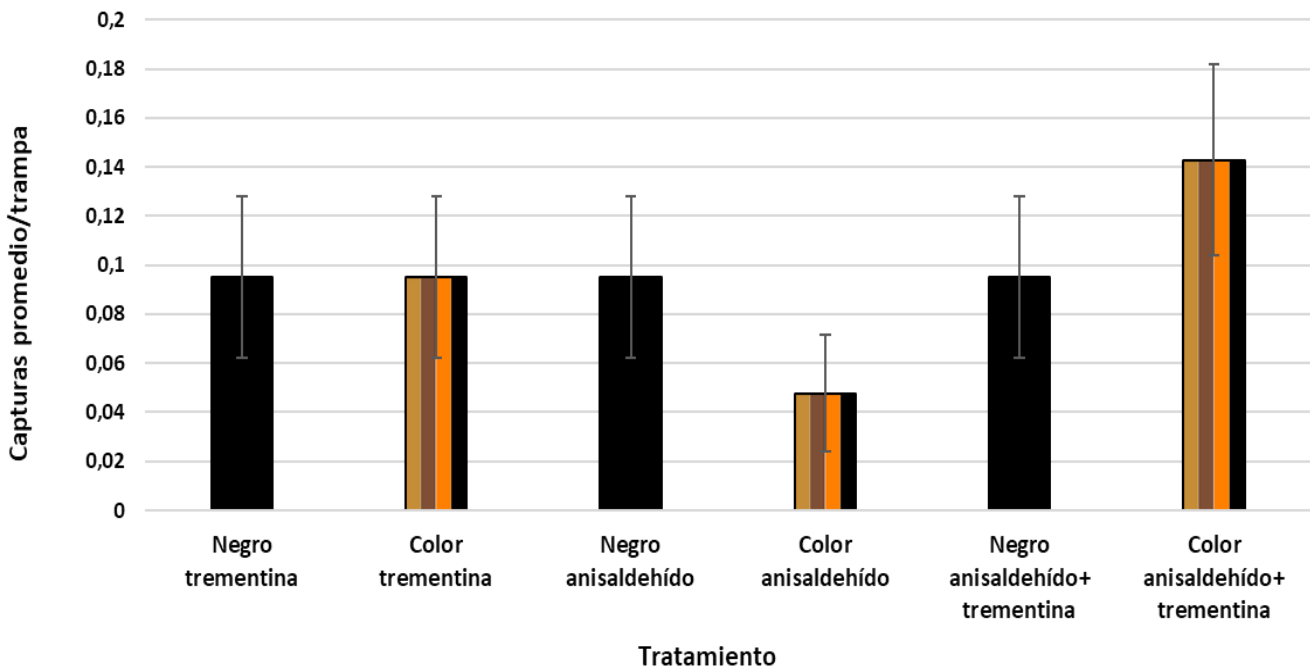


Figura 34. Individuos (promedio) capturados por trampa en función al tratamiento (color de la trampa y claves químicas) durante la última temporada de trabajo (2021-2022). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a las capturas según el color de las trampas respecto a las trampas control ($p < 0.05$).

5.4 Discusión

5.4.1 Estudios confirmatorios con el anisaldehído

Mediante los estudios de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas, se confirmó la pureza e identidad del compuesto adquirido comercialmente y que el compuesto presente en las muestras de hongo en medio de cultivo artificial se trata del anisaldehído. Mediante el análisis de la respuesta antenal (CG-DEA) se pudo confirmar además que las hembras de *S. noctilio* efectivamente responden al anisaldehído. Esto concuerda con los resultados obtenidos en estudios anteriores donde también se ha detectado actividad electrofisiológica antenal hacia el p-anisaldehído en las hembras (Faal et al., 2021). Por lo cual, efectivamente se trata de un buen candidato para realizar ensayos comportamentales en la búsqueda de un posible atrayente químico para los insectos.

5.4.2 Respuesta en olfatómetro

Este trabajo es el primero en demostrar la atracción comportamental de las hembras hacia este compuesto volátil mediante ensayos de olfatometría en el laboratorio. Más aún, bajo estas condiciones se ha demostrado que el compuesto es incluso más atrayente que el hongo en crecimiento en medio artificial. Luego, se evaluó el comportamiento de las hembras al contrastar la respuesta hacia el anisaldehído contra la trementina y nuevamente se detectó una preferencia de las hembras por el compuesto sintético. En este punto, cabe destacar ciertas características propias del anisaldehído que lo diferencian de la trementina. Como se mencionó anteriormente, en primer lugar, dicho compuesto tiene una tasa de evaporación significativamente menor que la de la trementina. Por lo cual, en el caso de comprobarse un buen desempeño en el campo en cuanto al número de capturas, esto resultaría en una ventaja ya que las revisiones y de los cebos podrían espaciarse aún más en el tiempo (y con menores cantidades de compuesto). En este sentido, también es importante resaltar el componente económico, ya que no sólo se utilizaría una menor cantidad de dicha sustancia, sino que, además, resulta considerablemente más económico a nivel comercial (1lt de anisaldehído \approx 9.2 \$USD vs 1lt de trementina \approx 18

USD). Por lo tanto, estos factores fortalecen la propuesta del compuesto como un buen candidato para ser utilizado en el monitoreo de estos insectos.

Por último, se evaluó el comportamiento de las hembras al presentarles anisaldehído y Contorta+Hongo. En este último caso, no se evidenció preferencia por parte de las hembras. Según los objetivos planteados, la situación óptima esperada sería observar una preferencia hacia el compuesto sintético. Sin embargo, estos resultados demuestran que el anisaldehído (en estas condiciones y concentraciones), puede ser, al menos, tan atrayente como esta fuente de estímulos. Es importante volver a aclarar que aún no se ha concluido con esta serie de ensayos experimentales. En este sentido, se debería evaluar, por ejemplo, la respuesta comportamental de las hembras hacia posibles olores de fondo (ej., α y β pineno) en conjunto con el anisaldehído (posible olor indicador de un recurso).

5.4.3 Ensayo de campo

En la última temporada de trabajo, se evaluó el desempeño de las trampas panel incorporando la información química y visual que podría resultar relevante según los resultados previos de este proyecto. Se tuvo en cuenta el componente visual, con sus dos niveles (sin coloración y coloración combinada) y el componente químico con 3 niveles (cebo con olores del hospedador, con olores del hongo y con ambos). Se evaluaron entonces todas las combinaciones posibles de combinaciones de información visual y química propuestos. Es importante destacar que el anisaldehído no fue detectado a partir de la fuente de volátiles que resultó ser la preferida en los ensayos de olfatometría (Contorta+Hongo), lo cual podría deberse, por ejemplo, a una limitación metodológica. Por ejemplo, podrían no aparecer en la madera con crecimiento fúngico debido a estar “enmascarados” durante la identificación cromatográfica por algunos compuestos liberados por la madera con hongos en crecimiento. Sin embargo, teniendo en cuenta que los propios olores del hospedador podrían representar olores de fondo y los del hongo olores indicadores de recurso (OIR), resultó adecuado incorporar en los ensayos de campo un tercer nivel: anisaldehído en conjunto con la trementina (olores del hospedador). En cuanto a los resultados obtenidos, desafortunadamente se obtuvo un número de capturas extremadamente bajo. Lo cual no permitiría evidenciar

diferencias significativas en el número de capturas. Por lo tanto, se espera poder repetir los ensayos en próximas temporadas para intentar encontrar la combinación de claves que resulte en una máxima atracción para las hembras de *S. noctilio*. Más allá de contar con una importante evidencia acerca del potencial del anisaldehído como posible atrayente químico, éstos y otros estudios comportamentales adicionales serán necesarios para poder confirmarlo.

Capítulo 6. Discusión general y conclusiones finales

En este trabajo, se comenzó describiendo de manera general el proceso de las invasiones biológicas, focalizando en los organismos que además de ser potenciales invasores, pueden convertirse en plagas y causar importantes daños. Puntualmente, se refirió al manejo de plagas forestales, el cual difiere en varios aspectos importantes del manejo de plagas de cultivos agrícolas. La avispa de los pinos *S. noctilio* es una importante plaga forestal endémica de Eurasia que, durante el siglo XX, demostró un gran potencial invasor y se estableció en varios países del hemisferio sur e incluso en Norteamérica (Ciesla, 2003). En algunas de estas regiones de introducción, la avispa se ha convertido en una plaga primaria de algunas especies de pino, sobre todo cuando sus densidades poblacionales son elevadas (Rawlings, 1948; Hurley et al., 2007). El impacto de *S. noctilio* es importante y se produce por la rápida muerte del árbol atacado, pero, además, por el detrimento en la calidad de su madera. En este sentido, un punto fundamental en el manejo integrado de plagas, es el monitoreo de las poblaciones. Los mecanismos de detección a menudo deben emplear métodos de alta sensibilidad (ej. el uso de trampas cebadas con semioquímicos y coloraciones específicas) para incrementar las posibilidades de detectar plagas a bajas densidades. Por lo tanto, si se desea desarrollar una herramienta de captura sensible y eficiente, se debe comprender fundamentalmente las capacidades sensoriales de los organismos que están en conflicto. Es por ello que se realizaron estudios acerca de la ecología sensorial (química y visual) de esta especie, no sólo para conocer y comprender más acerca de este sistema, sino también para desarrollar nuevas herramientas que permitan un manejo eficiente y sustentable de la plaga.

Teniendo en cuenta nuestro objetivo general de trabajo de identificar atrayentes químicos y visuales especie-específicos de la avispa barrenadora de los pinos *S. noctilio* con el fin de incorporar dicha información a protocolos de monitoreo y manejo ambientalmente sustentable de la plaga. Y bajo la hipótesis de que en el proceso de búsqueda de sitios para la oviposición y/o cópula, existen claves químicas y visuales que serán determinantes para la atracción de las hembras de *S. noctilio*. Se propuso explorar claves químicas y visuales que pudieran resultar

ecológicamente relevantes para estos insectos. Los resultados y conclusiones principales de este trabajo se resumen en la Figura 35.

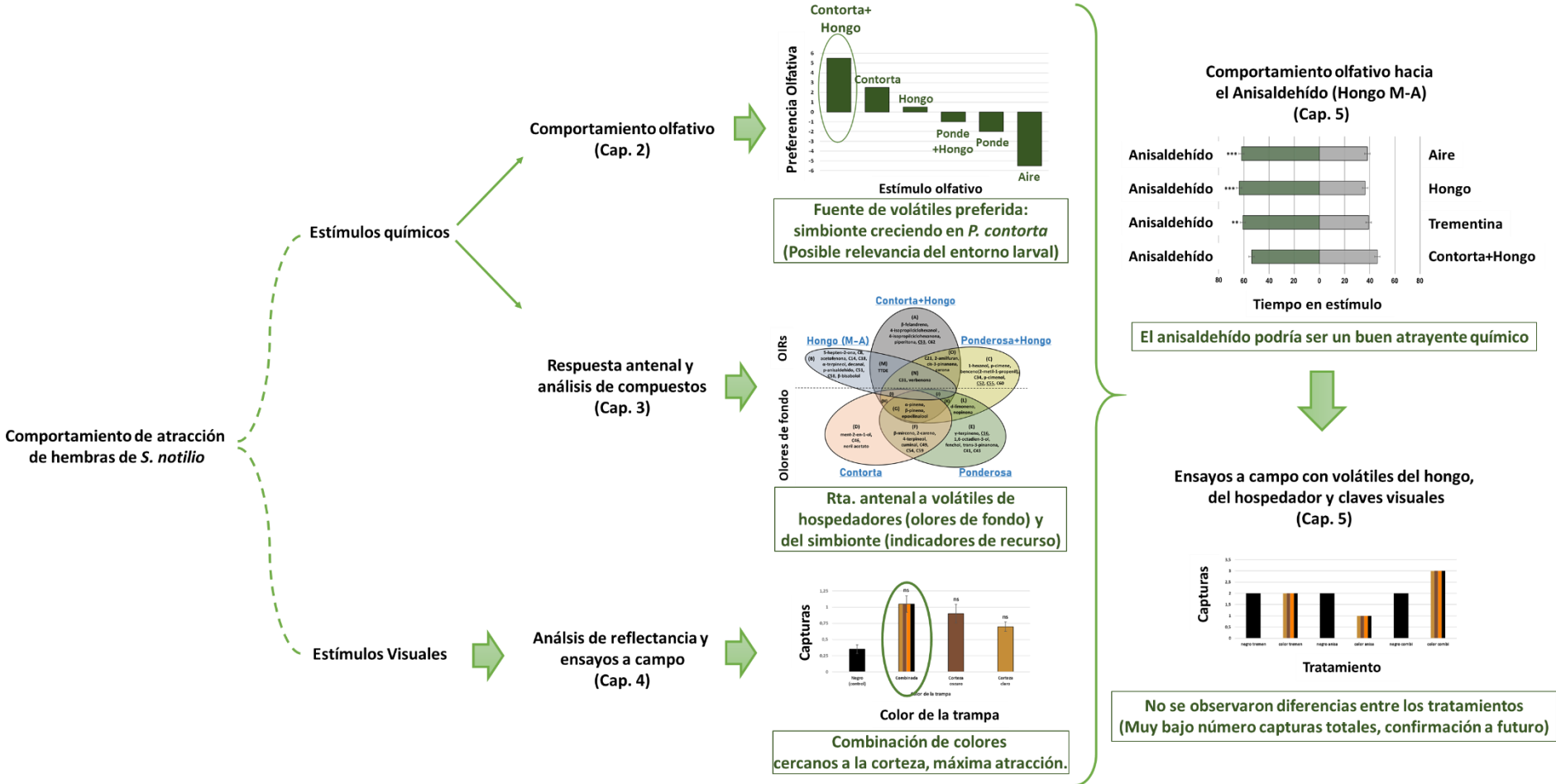


Figura 35. Resumen de los resultados del proyecto de tesis y las principales conclusiones.

En la primera sección de este trabajo se evaluó la respuesta comportamental y antenal de las hembras de *S. noctilio*, bajo la hipótesis de que las hembras de *S. noctilio* utilizan volátiles de su hongo simbionte *A. areolatum* y del pino para detectar árboles previamente atacados. En este caso, se predijo las hembras adultas de *S. noctilio* mostrarían una preferencia comportamental hacia el hongo simbionte con crecimiento en condiciones naturales (madera de *P. contorta* y *P. ponderosa*), frente al hongo que crece en medios artificiales o la madera sin hongo. Se propuso, además, que las hembras de *S. noctilio* mostrarían respuestas antenales a determinadas combinaciones de compuestos volátiles, según provengan de: el hongo simbionte creciendo en medio artificial, en madera del hospedador (*P. contorta* y *P. ponderosa*) o la madera sola. Dichas respuestas permitirían el discernimiento de las fuentes.

El primer resultado comportamental a destacar, fue la clara preferencia de las hembras de *Sirex noctilio* hacia *P. contorta* en lugar de *P. ponderosa*. Lo cual, según lo propuesto, podría ser el resultado de experiencias tempranas con el hospedador natal. Alternativamente, las hembras podrían mostrar una preferencia hacia *P. contorta* debido a su quimiotipo, independientemente de las especies hospederas donde las hembras hayan emergido. En este caso, las respuestas antenales permitieron detectar compuestos que podrían estar implicados en la diferenciación entre estas especies. Por ejemplo, se ha demostrado que el d-limoneno (presente en ambas fuentes con *P. ponderosa*) es un inhibidor del crecimiento del micelio de *A. areolatum* en bioensayos de laboratorio (Kile & Turnbull, 1974). Por lo tanto, este compuesto podría estar señalando un posible hospedador "menos adecuado" que restringe el crecimiento del simbionte.

Los resultados comportamentales globales sugieren que tanto el hongo como la madera son claramente relevantes y que particularmente las hembras de *S. noctilio* tienen una clara preferencia por fuentes que combinan el hongo en crecimiento sobre la especie de pino preferida (*P. contorta*). Se propuso entonces un posible escenario en donde un olor de fondo producido por un potencial hospedador en combinación con las emisiones del hongo simbiótico en crecimiento (OIRs) podría aumentar la atracción de las hembras cuando se perciben conjuntamente.

Según las respuestas antenales, compuestos como el α pineno y β pineno podrían formar parte de los olores de fondo. Esto concuerda con estudios anteriores (Coyle et al., 2012) e incluso estos compuestos forman parte de los atrayentes a base de kairomonas que se utilizan actualmente en las trampas en muchas partes del mundo con fines de control (Martínez et al., 2014). Por su parte, se detectaron compuestos que podrían estar señalando la presencia del hongo (OIRs) y por lo tanto resultar relevantes en cuanto a las preferencias observadas. El anisaldehído, por ejemplo, el cual fue detectado a partir del hongo en medio artificial y ante el cual ya se había reportado la actividad electrofisiológica antenal de las hembras (Faal et al., 2021).

En términos globales, las respuestas antenales indicaron que las hembras de *S. noctilio* detectaron una amplia gama de compuestos, con algunas respuestas a volátiles emitidos exclusivamente por una fuente, y otras compartidas por dos o más. Estas respuestas varían entre las fuentes analizadas, revelando (y confirmando) la capacidad de las hembras para discernir entre ellas (teniendo algunas de estas respuestas más peso que otras).

Más allá de estos análisis, es importante nuevamente destacar que existen múltiples posibilidades acerca de lo que podrían estar percibiendo a nivel sensorial las hembras de *S. noctilio* y que en última instancia es lo que desencadena las respuestas comportamentales.

Se puede decir entonces que los resultados obtenidos fueron acordes a la hipótesis y predicciones planteadas. Estos resultados vuelven a poner de manifiesto, el complejo mundo químico y las múltiples interacciones que pueden presentarse en el sistema *S. noctilio*-simbionte-hospedador. Finalmente, desde el punto de vista aplicado, haber obtenido esta información acerca de los volátiles liberados a partir de fuentes con el hongo simbionte, resulta fundamental. Combinar compuestos provenientes del hospedador (olores de fondo), con volátiles del hongo simbionte (OIRs) podría resultar en aumento significativo de la eficiencia de los dispositivos de captura que utilicen este tipo de calves.

En la siguiente sección, se enfocó en las claves visuales, que podrían ser un complemento importante para los insectos en el proceso de satisfacer las necesidades alimentarias, reproductivas y de supervivencia. En este sentido, se sabe que las avispas de *S. noctilio* tienen una evidente preferencia por cierto género particular de

plantas (*Pinus*) e incluso se demostró que podrían presentar preferencias entre distintas especies del género. Más aún, los árboles estresados (los cuales presentan una sintomatología particular a nivel visual, como la clorosis foliar), pueden atraer aún más a las hembras de estos insectos. Finalmente, en cuánto al proceso de búsqueda de conespecíficos para la cópula, existe un dimorfismo sexual marcado en esta especie, siendo que los machos de las avispas presentan una coloración particular distinta a la de las hembras. En este contexto, se propuso que existían claves visuales (color de la corteza del pino, acículas cloróticas de pinos y abdomen de machos), capaces de maximizar la respuesta de atracción por parte de las hembras de *S. noctilio*.

Con el objetivo de encontrar claves visuales que maximicen las capturas de las hembras de *S. noctilio* y aumentar la eficiencia de los dispositivos de captura utilizados, se llevó a cabo una caracterización de colores que podrían estar involucrados en la respuesta de atracción hacia las hembras. Mediante estudios de reflexión, se analizaron: trozos de corteza de *P. contorta*, acículas cloróticas de pinos y coloración del abdomen de los machos. Se compararon los espectros de emisión de estos objetos con los de una cartilla de colores comercial y se evaluaron los colores comerciales correspondientes en el campo. Para ello, se comparó el número de capturas de hembras de *S. noctilio* con trampas panel coloreadas (cebadas) vs trampas oscuras (cebadas). En este caso, se esperaba que las hembras de *S. noctilio* se vieran más atraídas hacia trampas con la coloración particular de (i) la corteza del pino, (ii) acículas cloróticas y (iii) el abdomen de machos, que hacia trampas negras.

Luego de dos temporadas de ensayos a campo con distintas coloraciones similares a los objetos analizados, no se encontraron diferencias significativas entre las trampas coloreadas y las trampas control (negras) normalmente utilizadas para el monitoreo de la especie. Sin embargo, luego de la segunda temporada de trabajo, se observó una tendencia (sin significancia estadística) por parte de las trampas con una combinación de coloraciones similares a la de las cortezas y que contaba además con una franja negra sin color. En este caso, no resulta llamativo que, en un proceso de búsqueda de hospedadores, las hembras se vean atraídas hacia trampas con este tipo de coloraciones y cebadas con olores de pinos.

Si bien el número de hembras observado sugería la existencia de una diferencia en cuanto a las capturas obtenidas (21 hembras con trampas con la combinación vs 8 hembras en trampas control), esta no pudo confirmarse estadísticamente. Es importante destacar que en esta segunda temporada se obtuvieron pocas capturas de hembras de *S. noctilio*, lo cual afecta directamente a la posibilidad de detectar diferencias estadísticas. Por lo tanto, más allá de los inconvenientes que se presentaron, se puede proponer que existe un potencial por parte de trampas coloreadas en maximizar las capturas de las hembras de *S. noctilio*. Más allá de no contar con evidencia estadística sólida de que esto suceda, es muy probable que la combinación de colores pueda tener un efecto positivo en el número de capturas y que, si el número de capturas totales hubiera sido mayor, estas diferencias se hubieran traducido en diferencias significativas. Futuros estudios podrían confirmar las tendencias observadas. Finalmente, en la última sección del trabajo, se propuso que debía existir algún compuesto emitido por el hongo simbiote capaz de atraer a las hembras de *S. noctilio*, y en conjunto con volátiles del hospedador (y claves visuales particulares) esta atracción se vería potenciada. Por lo tanto, se intentó encontrar, en primer lugar, un compuesto volátil particular que pudiera resultar en un buen atrayente químico para las hembras de *S. noctilio*. Con este objetivo, se logró adquirir uno de los compuestos orgánicos detectados a partir del hongo en crecimiento en medio artificial: el anisaldehído. A continuación, se confirmó la identidad y pureza del compuesto sintético (CG-EM) y la respuesta antenal de las hembras frente al mismo (CG.DEA). Además, también fue confirmada la presencia del anisaldehído en las muestras de volátiles del hongo en medio artificial. Por lo cual, efectivamente se trataba de un buen candidato para realizar ensayos comportamentales en la búsqueda de un posible atrayente químico para los insectos.

Se demostró, por primera vez (al menos de manera preliminar), la atracción comportamental de las hembras hacia este compuesto volátil mediante ensayos de olfatometría en el laboratorio (vs Aire). Más aún, bajo estas condiciones controladas, se ha demostrado que este compuesto es incluso más atrayente que el hongo en crecimiento en medio artificial e incluso que la trementina (sustancia obtenida a partir de resina de pinos y utilizada comúnmente para capturar y monitorear a las poblaciones de *S. noctilio*).

Al comprobar el posible potencial de este compuesto como atrayente químico en ensayos de laboratorio, se evaluó la respuesta de las hembras en el campo hacia distintas combinaciones de claves químicas y visuales. Por lo tanto, en la última temporada de trabajo, se intentó evaluar el desempeño de las trampas panel incorporando la información que podría resultar relevante según los resultados obtenidos hasta entonces. Se tuvo en cuenta el componente visual, con sus dos niveles: trampas sin coloración y con coloración combinada; y el componente químico con 3 niveles: cebo con olores del hospedador (trementina), con olores del hongo (anisaldehído) y con ambos (olores de fondo+OIR). Se evaluaron entonces todas las combinaciones posibles entre estos niveles propuestos. Es importante destacar que el anisaldehído no fue detectado a partir de la fuente de volátiles que resultó ser la preferida en los ensayos de olfatometría (Contorta+Hongo), lo cual podría deberse, por a una limitación metodológica (ej., enmascaramiento por otros compuestos en CG-EM). Siguiendo esta línea, tampoco se pudo evaluar en el laboratorio (por cuestiones logísticas y de tiempos), una posible sinergia entre los compuestos de la madera de *P. contorta* y el anisaldehído. Sin embargo, teniendo en cuenta que los propios olores del hospedador podrían representar olores de fondo y los del hongo olores indicadores de recurso (OIR), resultó adecuado incorporar en los ensayos de campo un tercer nivel: anisaldehído en conjunto con la trementina (olores del hospedador). En cuanto a los resultados obtenidos en el campo, desafortunadamente se obtuvo un número de capturas extremadamente bajo. Lo cual no permitiría evidenciar diferencias significativas en el número de capturas. Por lo tanto, se espera poder repetir los ensayos en próximas temporadas para intentar encontrar la combinación de claves que resulte en una máxima atracción para las hembras de *S. noctilio*. Más allá de esto, el anisaldehído ha resultado tener un importante potencial como atrayente de las hembras de *S. noctilio*. Este compuesto, en combinación con otras claves (químicas y visuales), podrían no sólo dar lugar a importantes interpretaciones biológicas, sino también al desarrollo de herramientas de monitoreo sustentables, altamente sensibles y específicas para la avispa invasora.

Mediante los estudios llevados a cabo en el presente proyecto, se ha sumado evidencia e información acerca del mundo químico altamente complejo en el que navegan las hembras de *S. noctilio* y las claves visuales que podrían

utilizar para localizar hospedadores adecuados y lugares de oviposición. Por primera vez, se ha demostrado que tanto los volátiles del hongo como de la madera son claramente relevantes y que las hembras de *S. noctilio* tienen una clara preferencia por fuentes que combinan el hongo en crecimiento sobre una de las especies de pino (*P. contorta*). Queda por confirmar en futuros estudios si la jerarquía observada en los niveles de atracción hacia las fuentes de volátiles analizadas es el resultado del entorno natal de la avispa o una diferencia debida a respuestas innatas. En este contexto, si las experiencias larvarias o adultas tempranas afectan al comportamiento en etapas posteriores de las hembras de *S. noctilio*, debe prestarse especial atención a la firma química de las especies de pino de monocultivo, ya que podría maximizar el atractivo del señuelo según las variaciones regionales de las especies de pino. En adición, se cuenta con una importante evidencia de que coloraciones similares a las cortezas de los hospedadores, en combinación con olores de pinos, podrían resultar relevantes durante el proceso de búsqueda de sitios para la oviposición. Por lo tanto, podrían resultar en una mayor atracción de las hembras de *S. noctilio* y aumentar la eficiencia de los dispositivos de captura. Finalmente, se demostró que el anisaldehído (un compuesto volátil emitido por el hongo simbiote), resulta un gran candidato a ser un importante atrayente químico para las hembras.

Más allá de contar con una importante evidencia acerca del potencial del anisaldehído y las claves visuales que sugieren ser relevantes, estudios comportamentales adicionales (en laboratorio y a campo), deberán realizarse a futuro para poder confirmarlo. Una mayor comprensión de la base química y visual del comportamiento de las hembras de *S. noctilio* guiará el desarrollo de señuelos altamente específicos y atractivos para maximizar la atracción de las avispas hembra en los programas de gestión de la vigilancia.

Índice de figuras

Figura 1. Etapas del proceso de invasión.....	8
Figura 2. Etapas del proceso de invasión en un contexto de plagas	12
Figura 3. Componentes básicos del sistema emisor-receptor	23
Figura 4. Hembra y macho adultos de <i>S. noctilio</i>	25
Figura 5. Estallido poblacional de <i>S. noctilio</i>	26
Figura 6. Ciclo de vida de <i>S. noctilio</i>	28
Figura 8. Larva y pupa de <i>S. noctilio</i> en madera del hospedador	30
Figura 9. Resumen del proyecto de tesis	42
Figura 10. Olfatómetro de 4 vías utilizado en los bioensayos	49
Figura 11. Respuestas comportamentales de las hembras de <i>S. noctilio</i> en el olfatómetro	54
Figura 12. Índices de Preferencia Olfativa (IPO).....	55
Figura 13. Sistemas de colecta de volátiles de 8 brazos.....	66
Figura 14. Sistema de detección electroantenográfica (CG-DEA/FID).	68
Figura 15. Ejemplo de una salida de CG-DEA	71
Figura 16. Ordenación por escalamiento multidimensional no métrico (NMDS)	72
Figura 17. Diagrama de Venn con compuestos detectados de las fuentes evaluadas.	74
Figura 18. Diagrama de Venn con compuestos detectados, en un contexto de olores de fondo-OIR.....	77
Figura 19. Objetos utilizados para los análisis de reflectancia.	88
Figura 20. Espectrómetro utilizado para los análisis de reflectancias.....	89
Figura 21. Trampas panel utilizadas en ensayos a campo.....	91
Figura 22. Ubicación geográfica de las plantaciones donde se realizaron los ensayos de campo (2019-2020) ..	92
Figura 23. Ejemplos de las coloraciones de las trampas utilizadas en el ensayo (2020-2021)	93
Figura 24. Ubicación geográfica de las plantaciones donde se realizaron los ensayos de campo (2020-2021) ..	94
Figura 25. Relación entre la reflectancia de un color comercial y la del abdomen de los machos de <i>S. noctilio</i>	96
Figura 26. Colores seleccionados para los ensayos de campo (2019-2020 y 2020-2021)	96
Figura 27. Individuos capturados por trampa en función al color de la trampa (2019-2020)	97
Figura 28. Individuos capturados por trampa en función al color de la trampa (2020-2021)	98
Figura 29. Estructura química del anisaldehído	104
Figura 30. Ubicación geográfica de las plantaciones donde se realizaron los ensayos (2021-2022)	110
Figura 31. Ejemplo de una salida de CG-DEA (Cap. 5).....	111

Figura 32. Salidas directas del análisis de datos de los estudios con CG-EM (Cap. 5) 113
Figura 33. Respuestas comportamentales de las hembras de *S. noctilio* en el olfatómetro (Cap. 5)..... 114
Figura 34. Individuos capturados por trampa en función al tratamiento (2021-2022). 115
Figura 35. Resumen de los resultados del proyecto y principales conclusiones. 121

Índice de tablas

Tabla 1. Combinaciones de fuentes de olor presentadas a una hembra de <i>Sirex noctilio</i> (Cap. 2)	51
Tabla 2. Conformación de la Preferencia Olfativa Parcial (POP)	52
Tabla 3. Conformación de los Índices de Preferencia Olfativa (IPO).....	55
Tabla 4. Amplitud de las respuestas antenales registradas y valores p del análisis de vectores del NMDS	71
Tabla 5. Comparaciones multivariantes por pares (ANOVA permutacional) según la fuente de estímulo	73
Tabla 6. Ejemplos de colores comerciales comparados y sus parámetros utilizados para el análisis	95
Tabla 7. Combinaciones de fuentes de olor presentadas a una hembra de <i>Sirex noctilio</i> (Cap. 5)	108

Bibliografía

- ACM Resinas. (s. f.). *Ficha técnica del Aguarrás (escencia de trementina)*. <https://acmresinas.com/wp-content/uploads/2017/07/FichaTécnica-EsenciaTrementina.pdf>
- Alcock, J. (1984). *Animal behavior: an evolutionary perspective*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Allison, J. D. (2021). Chemical ecology and trapping techniques for *Sirex noctilio*. *Biology and ecology of Sirex noctilio in north america*, 22.
- Allison, J. D., & Redak, R. A. (2017). The impact of trap type and design features on survey and detection of bark and woodboring beetles and their associates: A review and meta-analysis. *Annual Review of Entomology*, 62, 127-146.
- Allison, J. D., Slippers, B., Bouwer, M., & Hurley, B. P. (2019). Simulated leks increase the capture of female *Sirex noctilio* in the absence of host volatiles. *International Journal of Pest Management*, 67(1), 58-64.
- Alonso Fernández, A., & Castro Díez, P. (2015). Las invasiones biológicas y su impacto en los ecosistemas. *Ecosistemas: Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente (Ejemplar dedicado a: Las invasiones biológicas y su impacto en los ecosistemas)*, 24(1), 1-3.
- Anaman, K. A. (1994). Input-output analysis of the secondary impact of a screwworm fly invasion of Australia on the economy of Queensland. *Preventive Veterinary Medicine*, 21(1), 1-18.
- Angioy, A. M., Stensmyr, M. C., Urru, I., Puliafito, M., Collu, I., & Hansson, B. S. (2004). Function of the heater: the dead horse arum revisited. *Biological Sciences*, 271(SUPPL. 3).
- Ankney, E., Swor, K., Satyal, P., & Setzer, W. N. (2022). Essential oil compositions of Pinus species (*P. contorta* subsp. *contorta*, *P. ponderosa* var. *ponderosa*, and *P. flexilis*); Enantiomeric distribution of terpenoids in Pinus species. *Molecules*, 27(17), 56-58.
- Anon. (1999). 100 yeras ago. *Nature*, 399, 309.
- Anton, S., & Homberg, U. (1999). Antennal lobe structure. *Insect Olfaction*, 97-124.
- Ayasse, M., Paxton, R. J., & Tengö, J. (2001). Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 46, 31-78.
- Ayres, M. ., Sullivan, J. M., Harrison, T., & Lombardero, M. J. (2009). Diagnosing the presence of *Sirex noctilio* from examination of dead and dying pine trees. *Report for USDA APHIS*.
- Baker, T. C., Fadamiro, H. Y., & Cosse, A. A. (1998). Moth uses fine tuning for odour resolution. *Nature*, 393(6685), 530-530.
- Bangsund, D. A., Leistriz, F. L., & Leitch, J. A. (1999). Assessing economic impacts of biological control of weeds: The case of leafy spurge in the northern Great Plains of the United States. *Journal of Environmental Management*, 56(1), 35-43.
- Barnes, B. F., Meeker, J. R., Johnson, W., Asaro, C., Miller, D. R., & Gandhi, K. J. K. (2014). Trapping techniques for siricids and their parasitoids (Hymenoptera: Siricidae and Ibaliiidae) in the southeastern United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 107(1), 119-127.
- Barth, F., & Schmidt, A. (2001). *Ecology of Sensing*. Springer Verlag.

- Bashford, R. (2008). The development of static trapping systems to monitor for wood-boring insects in forestry plantations. *Australian Forestry*, 71(3), 236-241.
- Bashford, R., & Madden, J. L. (2011). The use of kairomone lures for the detection of *Sirex noctilio* in susceptible *Pinus radiata* plantations in Australia. En *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont: Research and Management of a Worldwide Invasive Pest* (pp. 159-166). Springer Netherlands.
- Batista, E. S. P., Redak, R. A., Busoli, A. C., Camargo, M. B., & Allison, J. D. (2018). Trapping for sirex woodwasp in brazilian pine plantations: lure, trap type and height of deployment. *Journal of Insect Behavior*, 31(2), 1-12.
- Bedding, R. A. (1972). Biology of *Deladenus siricidicola* (Neotylenchidae) entomophagous mycetophagous nematodes parasitic in siricid woodwasps. *Nematologica*, 18, 842-893.
- Bernays, A. E. (2001). Neural limitations in phyrophagous insects: implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annual review of entomology*, 46, 703-727.
- Berryman, A. A. (1987). The theory and classification of outbreaks. *Insect outbreaks.*, 3-30.
- Blackburn, T., Lockwood, J., & Cassey, P. (2009). *Avian invasions: the ecology and evolution of exotic birds* (Vol. 1). Oxford University Press.
- Böröczky, K., Crook, D. J., Jones, T. H., Kenny, J. C., Zylstra, K. E., Mastro, V. C., & Tumlinson, J. H. (2009). Monoalkenes as contact sex pheromone components of the woodwasp *Sirex noctilio*. *Journal of Chemical Ecology*, 35(10), 1202-1211.
- Böröczky, K., Zylstra, K. E., McCartney, N. B., Mastro, V. C., & Tumlinson, J. H. (2012). Volatile profile differences and the associated *Sirex noctilio* activity in two host tree species in the northeastern United States. *Journal of Chemical Ecology*, 38(2), 213-221.
- Boros, C. B. (1968). The relationship between the woodwasp *Sirex notilio* F. and the wood-rot fungus *Amylostereum* Sp. En (*Doctoral dissertation*).
- Borst, A. (2009). *Drosophila's* view on insect vision. *Current Biology*, 19(1), R36-R47.
- Bradbury, J. W., & Vehrencamp, S. L. (1998). *Principles of animal communication*. Sinauer Associates, Sunderland, MS.
- Briscoe, A. D., & Chittka, L. (2003). The evolution of color vision in insects. *Annual Review of Entomology*, 46, 471-510.
- Bruzzone, O. A., Villacide, J. M., Bernstein, C., & Corley, J. C. (2009). Flight variability in the woodwasp *Sirex noctilio* (Hymenoptera:Siricidae): an analysis of flight data using wavelets. *Journal of Experimental Biology*, 212(5), 731-737.
- Büchner, P. (1965). *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Wiley.
- Burt, E. T., & Catton, W. T. (1956). Electrical responses to visual stimulation in the optic lobes of the locust and certain other insects. *The Journal of Physiology*, 133(1), 68.
- Cartwright, K. G. (1929). Notes on the fungus associated with *Sirex cyaneus*. *Annals of Applied Biology*, 16, 182-432.
- Caton, B. P., Dobbs, T. T., & Brodel, C. F. (2006). Arrivals of hitchhiking insect pests on international cargo aircraft at Miami International Airport. *Biological Invasions*, 8(4), 765-785.

- Christensen, T. A. (2004). *Methods in insect sensory neuroscience*. CRC Press.
- Ciesla, W. M. (2003). European woodwasp: a potential threat to North America's conifer forests. *Journal of Forestry*, 101(2), 18-23.
- Clements, A. N. (1999). *The biology of mosquitoes. Volume 2: sensory reception and behaviour*. (D. Allsopp, R. R. Colwell, & D. L. Hawksworth (eds.)). CABI Publishing.
- Cocroft, R. B., & McNett, G. D. (2006). Vibratory communication in treehoppers (Hemiptera: Membracidae). En *Insect sounds and communication: physiology, behaviour, ecology and evolution* (pp. 305-317). CRC Press London.
- Cooperband, M. F., Böröczky, K., Hartness, A., Jones, T. H., Zylstra, K. E., Tumlinson, J. H., & Mastro, V. C. (2012). Male-produced pheromone in the european woodwasp, *Sirex noctilio*. *Journal of Chemical Ecology*, 38(1), 52-62.
- Corley, J. C., María, ·, Lantschner, V., Andrés, ·, Martínez, S., Fischbein, D., & Villacide, J. M. (2019). Management of *Sirex noctilio* populations in exotic pine plantations: critical issues explaining invasion success and damage levels in South America. *Journal of Pest Science*, 92, 131-142.
- Corley, J. C., Villacide, J. M., & Bruzzone, O. A. (2007). Spatial dynamics of a *Sirex noctilio* woodwasp population within a pine plantation in Patagonia, Argentina. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 125(3), 231-236.
- Costanzo, K., & Monteiro, A. (2007). The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1611), 845-851.
- Costello, S. L., Negro'n, J. F., Negro'n, N., & Jacobi, W. R. (2008). Traps and attractants for wood-boring insects in ponderosa pine stands in the Black Hills, south Dakota. *Journal of Economic Entomology*, 101(2), 409-420.
- Coutts, M. P. (1969a). The mechanism of pathogenicity of *Sirex noctilio* on *Pinus radiata* I. Effects of the symbiotic fungus *Amylostereum* Sp. (Thelophoraceae). *Australian Journal of Biological Sciences*, 22(4).
- Coutts, M. P. (1969b). The mechanism of pathogenicity of *Sirex noctilio* on *Pinus radiata* II. Effects of *S. noctilio* mucus. *Australian Journal of Biological Sciences*, 22(5), 1153-1162.
- Coutts, M. P., & Dolezal, J. E. (1965). *Sirex noctilio*, its associated fungus, and some aspects of wood moisture content. *Australian Forest Research*, 1(4), 3-13.
- Coutts, M. P., & Dolezal, J. E. (1969). Emplacement of fungal spores by the woodwasp, *Sirex noctilio*, during oviposition. *Forest Science*, 15(4), 412-416.
- Coyle, D. R., & Gandhi, K. J. K. (2012). The ecology, behavior, and biological control potential of hymenopteran parasitoids of woodwasps (Hymenoptera: Siricidae) in north America. *Environmental Entomology*, 41(4), 731-749.
- Coyle, D. R., Pfammatter, J. A., Journey, A. M., Pahs, T. L., Cervenka, V. J., & Koch, R. L. (2012). Community composition and phenology of native Siricidae (Hymenoptera) attracted to semiochemicals in Minnesota. *Environmental Entomology*, 41(1), 91-97.
- Crook, D. J., Böröczky, K., Zylstra, K. E., Mastro, V. C., & Tumlinson, J. H. (2012). The chemical ecology of *Sirex noctilio*. En *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont: Research and Management of a Worldwide Invasive Pest* (pp. 149-158).
- Crooks, J. A., Chang, A. L., & Ruiz, G. M. (2011). Aquatic pollution increases the relative success of invasive

- species. *Biological Invasions*, 13(1), 165-176.
- Dafni, A., Lehrer, M., & Kevan, P. G. (1997). Spatial flower parameters and insect spatial vision. *Biological Reviews*, 72(2), 239-282.
- Davel, M. (2008). Estimación de la productividad de sitio. En *Establecimiento y manejo del pino oregón en Patagonia. Esquel, Argentina: CIEFAP* (pp. 30-42).
- Davis, M. A. (2009). *Invasion biology*. Oxford University Press on Demand.
- Davis, M. A., Chew, M. K., Hobbs, R. J., Lugo, A. E., Ewel, J. J., Vermeij, G. J., Brown, J. H., Rosenzweig, M. L., Gardener, M. R., Carroll, S. P., Thompson, K., Pickett, S. T. A., Stromberg, J. C., Tredici, P. Del, Suding, K. N., Ehrenfeld, J. G., Philip Grime, J., Mascaro, J., & Briggs, J. C. (2011). Don't judge species on their origins. *Nature* 2011 474:7350, 474(7350), 153-154.
- de Groot, P., Nystrom, K., & Scarr, T. (2006). Discovery of *Sirex Noctilio* (Hymenoptera: Siricidae) in Ontario, Canada. *The great lakes entomologist*, 39(1).
- DeBach, P. (1951). The necessity for an ecological approach to pest control on citrus in California. *Journal of Economic Entomology*, 44(4), 443-447.
- Dekker, T., Steib, B., Cardé, R. T., & Geier, M. (2002). L-lactic acid: a human-signifying host cue for the anthropophilic mosquito *Anopheles gambiae*. *Medical and veterinary entomology*, 16(1), 91-98.
- Derraik, J. G. B. (2004). Exotic mosquitoes in New Zealand: a review of species intercepted, their pathways and ports of entry. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 28(5), 433-444.
- Devetak, D. (1998). Detection of substrate vibration in Neuropteroidea: a review. *Acta Zoologica Fennica*, 209, 87-94.
- Dicke, M., & Van Loon, J. J. A. (2000). Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97(3), 237-249.
- Dodds, K. J., & De Groot, P. (2012). *Sirex*, surveys and management: challenges of having *Sirex noctilio* in North America. *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont: Research and Management of a Worldwide Invasive Pest*, 265-286.
- Dreistadt, S. H., & Weber, D. C. (1989). Gypsy moth in the Northeast and Great Lakes states. En R. Dahlsten, DL and Garcia (Ed.), *Eradication of Exotic Pests* (pp. 229-256).
- Dukas, R. (2008). Evolutionary biology of insect learning. *Annual Review of Entomology*, 53(1), 145-160.
- Dusenbery, D. (1992). *Sensory ecology: how organisms acquire and respond to information*. Freeman.
- Ehrenfeld, J. G. (2010). Ecosystem consequences of biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41, 59-80.
- Eisner, T., Silberglied, R. E., Aneshansley, D., Carrel, J. E., & Howland, H. C. (1969). Ultraviolet Video-Viewing: The Television Camera as an Insect Eye. *Science*, 166(3909), 1172-1174.
- Eldridge, R. H., & Simpson, J. A. (2013). Development of contingency plans for use against exotic pests and diseases of trees and timber. *Australian Forestry*, 50(1), 24-36.
- Elton, C. S. (1958). The reasons for conservation. *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*, 143-153.

- Emmett Duffy, J. (2009). Why biodiversity is important to the functioning of real-world ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(8), 437-444.
- Endler, J. A. (1993). Some general comments on the evolution and design of animal communication systems. *Biological Sciences*, 340(1292), 215-225.
- Enserink, M. (1999). Biological invaders sweep in. *Science*, 285(5435), 1834-1836.
- Erbilgin, N., Stein, J. D., Acciavatti, R. E., Gillette, N. E., Mori, S. R., Bischel, K., Cale, J. A., Carvalho, C. R., & Wood, D. L. (2017). A Blend of ethanol and (-)- α -pinene were highly attractive to native siricid woodwasps (Siricidae, Siricinae) infesting conifers of the Sierra Nevada and the Allegheny Mountains. *Journal of Chemical Ecology*, 43(2), 172-179.
- Essl, F., Dullinger, S., Rabitsch, W., Hulme, P. E., Hülber, K., Jarošík, V., Kleinbauer, I., Krausmann, F., Kühn, I., Nentwig, W., Vilà, M., Genovesi, P., Gherardi, F., Desprez-Loustau, M. L., Roques, A., & Pyšek, P. (2011). Socioeconomic legacy yields an invasion debt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), 203-207.
- Evans, J. (1992). *Plantation forestry in the tropics: tree planting for industrial, social, environmental, and agroforestry purposes*. Oxford University Press.
- Evans, J. (1999). Planted forests of the wet and dry tropics: their variety, nature, and significance. *New Forests*, 17(1-3), 25-36.
- Faal, H., Cha, D. H., Hajek, A. E., & Teale, S. A. (2021). A double-edged sword: *Amylostereum areolatum* odors attract both *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae) and its parasitoid, *Ibalia leucospoides*. *Fungal Ecology*, 54.
- FAO. (2007). *Buena gobernanza en la tenencia y la administracion de tierras/Good governance in land tenure and administration* (9.ª ed.). Food & Agriculture Org.
- Fernández Ajó, A. A., Martínez, A. S., Villacide, J. M., & Corley, J. C. (2015). Behavioural response of the woodwasp *Sirex noctilio* to volatile emissions of its fungal symbiont. *Journal of Applied Entomology*, 139(9), 654-659.
- Fong, L. K., & Crowden, R. K. (1973). Physiological effects of mucus from the wood wasp, *Sirex Noctilio* F., On the Foliage Of *Pinus Radiata* D. Don. *Australian Journal of Biological Sciences*, 26(2), 365-378.
- Francke-Grosman, H. (1939). On the symbiosis of woodwasps (Siricinae) with fungi. *Angew. Entomol.*, 25, 647-679.
- Fukushi, T. (1989). Learning and discrimination of coloured papers in the walking blowfly, *Lucilia cuprina*. *Journal of Comparative Physiology A*, 166(1), 57-64.
- Gabel, B., Thiéry, D., Suchy, V., Marion-Poll, F., Hradsky, P., & Farkas, P. (1992). Floral volatiles of *Tanacetum vulgare* L. attractive to *Lobesia botrana* den. et schiff. females. *Journal of Chemical Ecology*, 18(5), 693-701.
- Galil, B. S. (2007). Loss or gain? Invasive aliens and biodiversity in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 55(7-9), 314-322.
- Gandolfi, M., Mattiacci, L., & Dorn, S. (2003). Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1533), 2623-2629.

- García-Berthou, E., Almeida, D., Benejam, L., Magellan, K., Bae, M. J., Casals, F., & Merciai, R. (2015). Impacto ecológico de los peces continentales introducidos en la península ibérica. *Ecosistemas*, 24(1), 36-42.
- Gassó, N., Pyšek, P., Vilà, M., & Williamson, M. (2010). Spreading to a limit: The time required for a neophyte to reach its maximum range. *Diversity and Distributions*, 16(2), 310-311.
- Gavini, S. S., Quintero, C., & Tadey, M. (2019). Ecological role of a flower-dwelling predator in a tri-trophic interaction in northwestern Patagonia. *Acta Oecologica*, 95, 100-107.
- Gibbs, J., & Evans, H. (2000). Pests and diseases. *Annual Report and Accounts - Forest Research, 1999-2000*, 9-15.
- Gibbs, N. (1996). Environmental impact assessment of aerial spraying Btk (*Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki) in New Zealand to eradicate white-spotted tussock moth (*Orgyia thyellina*). *New Zealand Ministry of Forestry*.
- Gilmour, J. W. (1965). The life cycle of the fungal symbiont of *Sirex noctilio*. *New Zealand Journal of Forestry*, 10, 80-89.
- Giunti, G., Benelli, G., Messing, R. H., & Canale, A. (2016). Early adult learning affects host preferences in the tephritid parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Pest Science*, 89(2), 529-537.
- Glowka, L., Burhenne-Guilmin, F., Synge, H., McNeely, J. A., & Gündling, L. (1994). *A guide to the Convention on Biological Diversity*. IUCN: International Union for Conservation of Nature.
- Gray, D. K., Johengen, T. H., Reid, D. F., & MacIsaac, H. J. (2007). Efficacy of open-ocean ballast water exchange as a means of preventing invertebrate invasions between freshwater ports. *Limnology and Oceanography*, 52(6), 2386-2397.
- Greenfield, M. D. (2002). *Signalers and receivers: mechanisms and evolution of arthropod communication*. Oxford University Press.
- Guignard, Q., Spaethe, J., Slippers, B., Strube-Bloss, M., & Allison, J. D. (2021). Evidence for UV-green dichromacy in the basal hymenopteran *Sirex noctilio* (Siricidae). *Scientific Reports*, 11(1), 1-10.
- Habit, E., González, J., Ortiz-Sandoval, J., Elgueta, A., & Sobenes, C. (2015). Efectos de la invasión de salmónidos en ríos y lagos de Chile. *Ecosistemas*, 24(1), 43-51.
- Hajek, A. E., Harris, D. C., & Bittner, T. D. (2018). Symbiont Spillover from Invasive to Native Woodwasps. *Microbial Ecology*, 75(1), 7-9.
- Hajek, A. E., Tobin, P. C., Kroll, S. A., & Long, S. J. (2018). Symbionts mediate oviposition behaviour in invasive and native woodwasps. *Agricultural and Forest Entomology*, 20(3), 442-450.
- Hardie, R. C. (2001). Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 204(20), 3403-3409.
- Haugen, D., Bedding, R., & Underdown, M. (1990). National strategy for control of *Sirex noctilio* in Australia. *Australian Forestry*, 13(2).
- Head, M. L., Keogh, J. S., & Doughty, P. (2005). Male southern water skinks (*Eulamprus heatwolei*) use both visual and chemical cues to detect female sexual receptivity. *Acta Ethologica*, 8(2), 79-85.
- Heywood, V. . H. (1995). *Global biodiversity assessment*. Cambridge University Press.
- Higgins, S. I., & Richardson, D. M. (1998). Pine invasions in the southern hemisphere: modelling interactions between organism, environment and disturbance. *Plant Ecology*, 135(1), 79-93.

- Hoebeke, E. R., Bittner, T., Hajek, A. E., & Liebherr, J. K. (2005). *Sirex noctilio*: Discovery of a Palearctic Siricid Woodwasp in New York. (revised 2005, July 07).
- Hosking, G. (1998a). White-spotted tussock moth—an aggressive eradication strategy. *Aliens*, 7, 4-5.
- Hosking, G. (1998b). White-spotted tussock moth in New Zealand. *Antenna*, 22, 74-76.
- Hurley, B. P., Garnas, J., & Cooperband, M. F. (2015). Assessing trap and lure effectiveness for the monitoring of *Sirex noctilio*. *Agricultural and Forest Entomology*, 17(1), 64-70.
- Hurley, B. P., Slippers, B., & Wingfield, M. J. (2007). A comparison of control results for the alien invasive woodwasp, *Sirex noctilio*, in the southern hemisphere. *Agricultural and Forest Entomology*, 9(3), 159-171.
- Iede, E. T., S.R.C., P., & Schaitza, E. G. (1998). *Sirex noctilio* problem in Brazil – detection, evaluation and control. In: Iede E, Shaitza E, Penteado S, Reardon R, Murphy T (eds) *Proceedings of a conference: training in the control of Sirex noctilio by use of natural enemies*.
- Jofré, N., Pildain, M. B., Cirigliano, A. M., Cabrera, G. M., Corley, J. C., & Martínez, A. S. (2016). Host selection by *Ibalia leucospoides* based on temporal variations of volatiles from the hosts' fungal symbiont. *Journal of Applied Entomology*, 140(10), 736-743.
- Jönsson, M., & Anderson, P. (1999). Electrophysiological response to herbivore-induced host plant volatiles in the moth *Spodoptera littoralis*. *Physiological Entomology*, 24(4), 377-385.
- Kandasamy, D., Zaman, R., Nakamura, Y., Zhao, T., Hartmann, H., Andersson, M. N., Hammerbacher, A., & Gershenzon, J. (2021). Bark beetles locate fungal symbionts by detecting volatile fungal metabolites of host tree resin monoterpenes. En *bioRxiv*.
- Kanzaki, R., Soo, K., Seki, Y., & Wada, S. (2003). Projections to higher olfactory centers from subdivisions of the antennal lobe macroglomerular complex of the male silkworm. *Chemical Senses*, 28(2), 113-130.
- Karr, L. L., & Coats, J. R. (1988). Insecticidal properties of d-limonene. *Journal of Pesticide Science*, 13(2), 287-290.
- Keeley, J. E., & Zedler, P. H. (1998). Evolution of life histories in Pinus. En D. . Richardson (Ed.), *Ecology and biogeography of Pinus* (pp. 219-250). Cambridge University Press.
- Keeling, C. I., Plettner, E., & Slessor, K. N. (2004). Hymenopteran semiochemicals. *Springer*, 133-177.
- Kelber, A., Vorobyev, M., & Osorio, D. (2003). Animal colour vision – behavioural tests and physiological concepts. *Biological Reviews*, 78(1), 81-118.
- Kennedy, G. G., & Sutton, T. B. (2000). Emerging technologies for integrated pest management. *APS Press*.
- Khalanski, M. (1997). Conséquences industrielles et écologiques de l'introduction de nouvelles espèces dans les hydrosystèmes continentaux : la moule zébrée et autres espèces invasives. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 344(344-345), 385-404.
- Kile, G., & Turnbull, C. (1974). The effect of *Radiata* Pine resin and resin components on the growth of the *Sirex* symbiont *Amylostereum Areolatum*. *Australian Forest research*, 6(4), 27-34.
- Kimberg, P. K., Woodford, D. J., Roux, H., & Weyl, O. L. F. (2014). Species-specific impact of introduced largemouth bass *Micropterus salmoides* in the groot marico freshwater ecosystem priority area, South Africa. *African Journal of Aquatic Science*, 39(4), 451-458.

- King, J. M. (1966). Some aspects of the biology of the fungal symbiont of *Sirex noctilio* (F.). *Australian Journal of Botany*, 14, 25-30.
- Kinoshita, M., & Arikawa, K. (2014). Color and polarization vision in foraging *Papilio*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 200(6), 513-526.
- Knowler, D., & Barbier, E. B. (2000). The economics of an invading species: a theoretical model and case study application. *The Economics of Biological Invasions*. Edward Elgar Publishing, Cheltenham, 70-93.
- Koch, N. E., & Skovsgaard, J. P. (1999). Sustainable management of planted forests: some comparisons between central Europe and the United States. *Planted Forests: Contributions to the Quest for Sustainable Societies*, 11-22.
- Kolar, C. S., & Lodge, D. M. (2001). Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(4), 199-204.
- Kozlov, M. V., Zhu, J., Philipp, P., Francke, W., Zvereva, E. L., Hansson, B. S., & Löfstedt, C. (1996). Pheromone specificity in *Eriocrania semipurpurella* (Stephens) and *E. sangii* (Wood) (Lepidoptera: Eriocraniidae) based on chirality of semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 22, 431-454.
- Kukor, J. J., & Martin, M. M. (1983). Acquisition of digestive enzymes by siricid woodwasps from their fungal symbiont. *Science*, 220(4602), 1161-1163.
- Labhart, T., & Meyer, E. P. (2002). Neural mechanisms in insect navigation: polarization compass and odometer. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(6), 707-714.
- Land, M. F., & Nilsson, D. E. (2002). *Animal Eyes*. Oxford University Press.
- Landolt, P. J., Heath, R. R., Millar, J. G., Davis-Hernandez, K. M., Dueben, B. D., & Ward, K. E. (1994). Effects of host plant, *Gossypium hirsutum* L., on sexual attraction of cabbage looper moths, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of chemical ecology*, 20(11), 2959-2974.
- Lantschner, M. V., & Corley, J. C. (2015). Spatial pattern of attacks of the invasive woodwasp *Sirex noctilio*, at landscape and stand scales. *PLOS ONE*, 10(5).
- Ledgard, N. (2001). The spread of lodgepole pine (*Pinus contorta*, Dougl.) in New Zealand. *Forest Ecology and Management*, 141(1-2), 43-57.
- Ledig, F. T. (1992). Human Impacts on Genetic Diversity in Forest Ecosystems. *Oikos*, 63(1), 87.
- Lewis, W. J., Van Lenteren, J. C., Phatak, S. C., & Tumlinson, J. H. (1997). A total system approach to sustainable pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23), 12243-12248.
- Li, D., Shi, J., Lu, M., Ren, L., Zhen, C., & Luo, Y. (2015). Detection and identification of the invasive *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae) fungal symbiont, *Amylostereum areolatum* (Russulales: Amylostereaceae), in China and the stimulating effect of insect venom on laccase production by *A. are.* *Journal of Economic Entomology*, 108(3), 1136-1147.
- Liebholt, A. M., Elkinton, J. S., Zhou, G., Hohn, M. E., Rossi, R. E., Boettner, G. H., Boettner, C. W., Burnham, C., & McManus, M. L. (1995). Regional correlation of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) defoliation with counts of egg masses, pupae, and male moths. *Environmental Entomology*, 24(2), 193-203.
- Liebholt, A. M., Halverson, J. A., & Elmes, G. A. (1992). Gypsy moth invasion in North America: a quantitative analysis. *Journal of Biogeography*, 19(5), 513.

- Liebholt, A. M., MacDonald, W. L., Bergdahl, D., & Mastro, V. C. (1995). Invasion by exotic forest pests: a threat to forest ecosystems. *Forest Science*, 41.
- Liebholt, A. M., Simons, E. E., Sior, A., & Unger, J. D. (1993). Forecasting defoliation caused by the gypsy moth from field measurements. *Environmental Entomology*, 22(1), 26-32.
- Liebholt, A. M., Work, T. T., McCullough, D. G., & Cavey, J. F. (2006). Airline baggage as a pathway for alien insect species invading the United States. *American Entomologist*, 52(1), 48-54.
- Linn, C., Feder, J. L., Nojima, S., Dambroski, H. R., Berlocher, S. H., & Roelofs, W. (2003). Fruit odor discrimination and sympatric host race formation in *Rhagoletis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11490-11493.
- Lockwood, J. L., Hoopes, M. F., & Marchetti, M. . (2013). *Invasion ecology*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Lonsdale, W. M. (1994). Inviting trouble: Introduced pasture species in northern Australia. *Australian Journal of Ecology*, 19(3), 345-354.
- Mack, M. C., & D'Antonio, C. M. (1998). Impacts of biological invasions on disturbance regimes. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(5), 195-198.
- Madden, J. L. (1968). Physiological aspects of host tree favourability for the woodwasp, *Sirex noctilio* F. *F. P Ecol Soc Aust*, 3, 147-149.
- Madden, J. L. (1971). Some treatments which render Monterey pine (*Pinus radiata*) attractive to the wood wasp *Sirex noctilio* F. *Bulletin of Entomological Research*, 60(3), 467-472.
<https://doi.org/10.1017/S0007485300040414>
- Madden, J. L. (1974). Oviposition behaviour of the woodwasp, *Sirex noctilio* F. *Australian Journal of Zoology*, 22(3), 341-351.
- Madden, J. L. (1977). Physiological reactions of *Pinus radiata* to attack by woodwasp, *Sirex noctilio* F. (Hymenoptera: Siricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 67(3), 405-426.
- Madden, J. L. (1981). Egg and larval development in the Woodwasp, *Sirex noctilio* F. *Australian Journal of Zoology*, 29(4), 473-481.
- Madden, J. L. (1988). *Sirex* in Australasia. *Dynamics of Forest Insect Populations*, 407-429.
- Madden, J. L., & Coutts, M. P. (1979). The role of fungi in the biology and ecology of wood wasps (Hymenoptera: Siricidae). En *Batra LR (ed) Insect-fungus symbiosis*. Allanheld, Osmun and Co, Totowa.
- Madden, J. L., & Irvine, C. J. (1971). The use of lure trees for the detection of *Sirex noctilio* in the field. *Australian Forestry*, 35, 164-166.
- Malun, D., Waldow, U., Kraus, D., & Boeckh, J. (1993). Connections between the deutocerebrum and the protocerebrum, and neuroanatomy of several classes of deutocerebral projection neurons in the brain of male *Periplaneta americana*. *Journal of Comparative Neurology*, 329(2), 143-162.
- Marin, E. C., Jefferis, G. S. X. E., Komiyama, T., Zhu, H., & Luo, L. (2002). Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell*, 109(2), 243-255.
- Martínez, A. S., Villacide, J., Fernández Ajó, A. A., Martinson, S. J., & Corley, J. C. (2014). *Sirex noctilio* flight behavior: Toward improving current monitoring techniques. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 152(2), 135-140.

- Martinson, S. J., Fernández Ajó, A. A., Martínez, A. S., Krivak-Tetley, F. E., Villacide, J. M., Ayres, M. P., & Corley, J. C. (2019). Attack rates of *Sirex noctilio* and patterns of pine tree defenses and mortality in northern Patagonia. *Bulletin of Entomological Research*, *109*(2), 141-149.
- McEvoy, T. J. (2004). *Positive impact forestry: a sustainable approach to managing woodlands*. Island Press.
- McNeely, C., & Singer, M. C. (2001). Contrasting the roles of learning in butterflies foraging for nectar and oviposition sites. *Animal Behaviour*, *61*(4), 847-852.
- Menzel, R., & Müller, U. (2003). Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annual Review of Neuroscience*, *19*, 379-404.
- Meurisse, N., Rassati, D., Hurley, B. P., Brockerhoff, E. G., & Haack, R. A. (2019). Common pathways by which non-native forest insects move internationally and domestically. *Journal of Pest Science*, *92*(1), 13-27.
- Millar, J. G., & Haynes, K. F. (1998). *Methods in chemical ecology I: Chemical methods*. Chapman & Hall, New York.
- Miller, M. D., & Marty, M. A. (2010). Impact of environmental chemicals on lung development. *Environmental Health Perspectives*, *118*(8), 1155-1164.
- Minor, A. V., & Kaissling, K. E. (2003). Cell responses to single pheromone molecules may reflect the activation kinetics of olfactory receptor molecules. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *189*(3), 221-230.
- Mitchell, P. L., & Kirby, K. J. (1989). *Ecological effects of forestry practices in long-established woodland and their implications for nature conservation* (U. of O. Oxford Forestry Institute (ed.)).
- Monge, J. (2007). ¿Qué son plagas vertebradas? *Agronomía costarricense*, *31*(2), 111-121.
- Morgan, F. D. (1968). Bionomics of Siricidae. *Annual Review of Entomology*, *13*(1), 239-256.
- Morgan, F. D., & Stewart, N. C. (1966). The biology and behaviour of the wood-wasp *Sirex noctilio* F. in New Zealand. *Transactions Roy. Soc. N.Z.*, *7*(14).
- Müller, J. (1826). *Sobre la fisiología comparada del sentido de la visión en el hombre y los animales: junto con un experimento sobre los movimientos de los ojos y sobre la mirada humana*. C. Cnobloch.
- Murlis, J., Elkinton, J. S., & Cardé, R. T. (1992). Odor plumes and how insects use them. *Annual Review of Entomology*, *37*(1), 505-532.
- Myers, J. H., Savoie, A., & Randen, E. V. (1998). Eradication and pest management. *Annual review of entomology*, *43*(1), 471-491.
- Nambiar, E. K. S. (2010). Pursuit of sustainable plantation forestry. *South African Forestry Journal*, *184*(1), 45-62.
- Neumann, F. G., & Minko, G. (1981). The sirex wood wasp in australian radiata pine plantations. *Australian Forestry*, *44*(1), 46-63.
- Neumann, F. G., Morey, J. L., & McKimm, R. J. (1987). *The sirex wasp in Victoria*. (Vol. 27).
- Neumeyer, C. (1980). Simultaneous color contrast in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology*, *139*(3), 165-176.
- Neumeyer, C. (1981). Chromatic adaptation in the honeybee: Successive color contrast and color constancy.

- Journal of Comparative Physiology*, 144(4), 543-553.
- Newsom, L. D. (1978). Eradication of plant pests. *Bulletin of the Entomological Society of America*.
- Niemelä, P., & Mattson, W. J. (1996). Invasion of North American forests by European phytophagous insects: legacy of the European crucible? *BioScience*, 46(10), 741-753.
- Nordlund, D. A., Lewis, W. J., & Gross Jr, H. R. (1981). Elucidation and employment of semiochemicals in the manipulation of entomophagous insects. En *Management of insect pests with semiochemicals: concepts and practice* (pp. 463-475). Springer US.
- Olatinwo, R., Allison, J., Meeker, J., Johnson, W., Streett, D., Aime, M. C., & Carlton, C. (2013). Detection and identification of *Amylostereum areolatum* (Russulales: Amylostereaceae) in the mycangia of *Sirex nigricornis* (Hymenoptera: Siricidae) in central Louisiana. *Environmental Entomology*, 42(6), 1246-1256.
- Overton, J. (1996). *Ecologically based pest management: new solutions for a new century*. National Academy Press, Washington, DC.
- Ozaki, M. (2005). Feeding behavior regulation in the Fly: effect of a noxious substance through the taste and olfactory neurons. *Chemical Senses*, 30(1), 289-290.
- Parker, I. M., Simberloff, D., Lonsdale, W. M., Goodell, K., Wonham, M., Kareiva, P. M., Williamson, M. H., Von Holle, B., Moyle, P. B., Byers, J. E., & Goldwasser, L. (1999). Impact: toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. *Biological Invasions*, 1(1), 3-19.
- Parkin, E. A. (1941). Symbiosis in larval Siricidae (Hymenoptera). *Nature*, 147(3724), 329.
- Parkin, E. A. (1942). Symbiosis and siricid woodwasps. *Annals of Applied Biology*, 29(3), 268-274.
- Perrings, C., Williamson, M., Barbier, E. B., Delfino, D., Dalmazzone, S., Shogren, J., Simmons, P., & Watkinson, A. (2002). Biological invasion risks and the public good: an economic perspective. *Conservation Ecology*, 6(1).
- Phelan, P. L. (1992). Evolution of sex pheromones and the role of asymmetric tracking. En Roitberg BD and Isman MB (Ed.), *Insect Chemical Ecology: An Evolutionary Approach* (pp. 265-314). Chapman & Hall, New York.
- Pilpel, Y., & Lancet, D. (1999). The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins. *Protein Science*, 8(5), 969-977.
- Pimentel, D. (1986). Biological invasions of plants and animals in agriculture and forestry. En *Ecology of biological invasions of North America and Hawaii* (pp. 149-162). Springer, New York, NY.
- Pimm, S. L. (1998). The forest fragment classic. *Nature*, 393(6680), 23-24.
- Plochmann, R. (1992). The forests of central Europe: a changing view. *Journal of Forestry*, 90(6), 12-41.
- Raffa, K. F., Aukema, B. H., Erbilgin, N., Klepzig, K. D., & Wallin, K. F. (2005). Interactions among conifer terpenoids and bark beetles across multiple levels of scale: an attempt to understand links between population patterns and physiological processes. *Recent Advances in Phytochemistry*, 39: 79-118.
- Raguso, R. A., & Willis, M. A. (2002). Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by naïve hawkmoths, *Manduca sexta*. *Animal Behaviour*, 64(5), 685-695.
- Rawlings, G. B. (1948). Recent observations on the *Sirex noctilio* population in *Pinus radiata* forest in New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry*, 5(5), 411-421.

- Rejmánek, M., & Pitcairn, M. J. (2002). When is eradication of exotic pest plants a realistic goal. En *Turning the tide: the eradication of invasive species* (pp. 249-253).
- Rey, J. M. (1976). Gestión sobre plagas en Entomología. *Graellsia*, 32, 279-306.
- Ricciardi, A., & Mac Isaac, H. J. (2008). The book that began invasion ecology. *Nature* 2008 452:7183, 452(7183), 34-34.
- Richardson, D. M. (1998). Forestry trees as invasive aliens. *Conservation Biology*, 12(1), 18-26.
- Richardson, D. M., Pyšek, P., Rejmánek, M., Barbour, M. G., Dane Panetta, F., & West, C. J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, 6(2), 93-107.
- Robert, D., Amoroso, J., & Hoy, R. R. (1992). The evolutionary convergence of hearing in a parasitoid Fly and its Cricket host. *Science*, 258(5085), 1135-1137.
- Rodriguez-Saona, C. R., & Stelinski, L. L. (2009). Behavior-modifying strategies in IPM: Theory and practice. *Integrated Pest Management*, 1, 263-315.
- Roques, A., & Auger-Rozenberg, M. A. (2006). Tentative analysis of the interceptions of non-indigenous organisms in Europe during 1995–20041. *EPPO Bulletin*, 36(3), 490-496.
- Ryan, K., & Hurley, B. P. (2012). Life history and biology of siren noctilio. *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont: Research and Management of a Worldwide Invasive Pest*, 15-30. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1960-6_2
- Rypstra, A. L., Schlosser, A. M., Sutton, P. L., & Persons, M. H. (2009). Multimodal signalling: the relative importance of chemical and visual cues from females to the behaviour of male wolf spiders (Lycosidae). *Animal Behaviour*, 77(4), 937-947.
- SAGPyA. (2001). Primer inventario de plantaciones forestales en macizo. *SAGPyA Forestal*, 20, 2-9.
- Sarvary, M. A., Cooperband, M. F., & Hajek, A. E. (2014). The importance of olfactory and visual cues in developing better monitoring tools for *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). *Agricultural and Forest Entomology*.
- Sarvary, M. A., Hajek, A. E., Böröczky, K., Raguso, R. A., & Cooperband, M. F. (2016a). Investigating the effects of symbiotic fungi on the flight behaviour of *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). *Canadian Entomologist*, 148(5), 543-551.
- Sarvary, M. A., Hajek, A. E., Böröczky, K., Raguso, R. A., & Cooperband, M. F. (2016b). Investigating the effects of symbiotic fungi on the flight behaviour of *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). *The Canadian Entomologist*, 148(5), 543-551.
- Schiestl, F. P., Ayasse, M., Paulus, H. F., Lofstedt, C., Hansson, B. S., Ibarra, F., & Francke, W. (1999). Orchid pollination by sexual swindle. *Nature*, 399, 421-421.
- Schlaepfer, M. A., Sax, D. F., & Olden, J. D. (2011). The potential conservation value of non-native species. *Conservation Biology*, 25(3), 428-437.
- Schlyter, F., & Birgersson, G. (1999). Forest beetles. En *Pheromones of non-Lepidopteran insects associated with agricultural plants* (pp. 113-148).
- Schmera, D., Tóth, M., Subchev, M., Sredkov, I., Szarukán, I., Jermy, T., & Szentesi, Á. (2004). Importance of visual and chemical cues in the development of an attractant trap for *Epicometis (Tropinota) hirta* Poda

- (Coleoptera: Scarabaeidae). *Crop Protection*, 23(10), 939-944.
- Schnaitmann, C., Pagni, M., & Reiff, D. F. (2020). Color vision in insects: insights from *Drosophila*. *Journal of Comparative Physiology A* 2020 206:2, 206(2), 183-198.
- Schoonhoven, L. M., Jermy, T., & Van Loon, J. J. A. (1998). Host-plant selection. En *Insect-plant biology* (pp. 121-153). Springer US.
- Schröder, R., & Hilker, M. (2008). The relevance of background odor in resource location by insects: a behavioral approach. *BioScience*, 58(4), 308-316.
- Schütz, S., Bleckmann, H., & Mürzt, M. (1997). Infrared detection in a beetle. *Nature*, 386, 773-774.
- Shields, V. D. C., & Hildebrand, J. G. (2001). Recent advances in insect olfaction, specifically regarding the morphology and sensory physiology of antennal sensilla of the female sphinx moth *Manduca sexta*. *Microscopy Research and Technique*, 55(5), 307-329.
- Shigesada, N., & Kawasaki, K. (1997). *Biological invasions: theory and practice* (U. Oxford University Press (ed.)).
- Shrestha, M., Dyer, A. G., Garcia, J. E., & Burd, M. (2019). Floral colour structure in two Australian herbaceous communities: it depends on who is looking. *Annals of Botany*, 124(2), 221-232.
- Simberloff, D., Martin, J. L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D. A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., Pyšek, P., Sousa, R., Tabacchi, E., & Vilà, M. (2013a). Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(1), 58-66.
- Simberloff, D., Martin, J. L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D. A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., Pyšek, P., Sousa, R., Tabacchi, E., & Vilà, M. (2013b). Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(1), 58-66.
- Simberloff, D., & Rejmanek, M. (2011). *Encyclopadia of Biological anivasions* (3.^a ed.). Univ of California Press.
- Simberloff, D., Souza, L., Núñez, M. A., Barrios-Garcia, M. N., & Bunn, W. (2012). The natives are restless, but not often and mostly when disturbed. *Ecology*, 93(3), 598-607.
- Simpson, R. F. (1976). Bioassay of pine oil components as attractants for *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae) using electroantennogram techniques. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 19(1), 11-18.
- Simpson, R. F., & McQuilkin, R. M. (1976). Identification of volatiles from felled *Pinus radiata* and the electroantennograms they elicit from *Sirex notcilio* F. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 19(3), 205-213.
- Smith, C. S., Lonsdale, W. M., & Fortune, J. (1999). When to ignore advice: invasion predictions and decision theory. *Biological Invasions*, 1(1), 89-96.
- Smith, R. H. (1963). Toxicity of pine resin vapors to three species of *Dendroctonus* bark beetles. *Journal of Economic Entomology*, 56(6), 827-831.
- Spradbery, J. P. (1973). A comparative study of the phytotoxic effects of siricid woodwasps on conifers. *Annals of Applied Biology*, 75(3), 309-320.
- Spradbery, J. P. (1977). The oviposition biology of siricid woodwasps in Europe. *Ecological Entomology*, 2(3), 225-230.
- Spradbery, J. P., & Kirk, A. A. (1978). Aspects of the ecology of siricid woodwasps (Hymenoptera: Siricidae) in

- Europe, North Africa and Turkey with special reference to the biological control of *Sirex noctilio* F. in Australia. *Bulletin of Entomological Research*, 68(3), 341-359.
- Spradbery, J. P., & Kirk, A. A. (1981). Experimental studies on the responses of European siricid woodwasps to host trees. *Annals of Applied Biology*, 98, 179-185.
- Stange, G., Stowe, S., Chahl, J. S., & Massaro, A. (2002). Anisotropic imaging in the dragonfly median ocellus: a matched filter for horizon detection. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural & Behavioral Physiology*, 188(6).
- Stensmyr, M. C., Urru, I., Collu, I., Celander, M., Hansson, B. S., & Angioy, A. M. (2002). Rotting smell of dead-horse arum florets. *Nature*, 420(6916), 625-626.
- Stern, V. M., Smith, R. F., van den Bosch, R., & Hagen, K. S. (1959). The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: the integrated control concept. *Hilgardia*, 29(2), 81-101.
- Stocker, R. F., Lienhard, M. C., Borst, A., & Fischbach, K. F. (1990). Neuronal architecture of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research*, 262(1), 9-34.
- Storeck, A., Poppy, G. M., Van Emden, H. F., & Powell, W. (2000). The role of plant chemical cues in determining host preference in the generalist aphid parasitoid *Aphidius colemani*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97(1), 41-46.
- Strausfeld, N. J., & Lee, J. K. (1991). Neuronal basis for parallel visual processing in the fly. *Visual Neuroscience*, 7(1-2), 13-33.
- Sutton, W. R. J. (1999). The need for planted forests and the example of radiata pine. *Planted Forests: Contributions to the Quest for Sustainable Societies*, 95-109.
- Sweeney, J. D., Shepherd, R. F., & McLean, J. A. (1990). Factors affecting catch in pheromone traps for monitoring the western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* Freeman. *The Canadian Entomologist*, 122(6), 1119-1130.
- Takemoto, H., Powell, W., Pickett, J., Kainoh, Y., & Takabayashi, J. (2012). Two-step learning involved in acquiring olfactory preferences for plant volatiles by parasitic wasps. *Animal behaviour*, 83(6), 1491-1496.
- Takken, W., & Knols, B. G. J. (1999). Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 44, 131-157.
- Talbot, P. H. B. (1977). The *Sirex*-*Amylostereum*-*Pinus* association. *Annual Review of Phytopathology*, 15(1), 41-54.
- Taylor, K. L., Kitching, R. L., & Jones, R. E. (1981). The *Sirex* woodwasp: ecology and control of an introduced forest insect. *The ecology of pests: some Australian case histories*. CSIRO, Canberra, Australia., 231-248.
- Thompson, B. M., Bodart, J., McEwen, C., & Gruner, D. S. (2014). Adaptations for symbiont-mediated external digestion in *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 107(2), 453-460.
- Thomson, R. C. M. (1991). *Trap responses of flying insects: the influence of trap design on capture efficiency*. Academic Press, London.
- Todd, J. L., & Baker, T. C. (1999). Function of peripheral olfactory organs. *Insect Olfaction*, 67-96.
- Tumlinson, J. H., Klein, M. G., Doolittle, R. E., Ladd, T. L., & Proveaux, A. T. (1977). Identification of the female

- Japanese beetle sex pheromone: inhibition of male response by an enantiomer. *Science*, 197, 789-792.
- van Loon, J. J. A., & Dicke, M. (2001). Sensory ecology of arthropods utilizing plant infochemicals. *Ecology of Sensing*, 253-270.
- Vilà, M., Basnou, C., Pyšek, P., Josefsson, M., Genovesi, P., Gollasch, S., Nentwig, W., Olenin, S., Roques, A., Roy, D., Hulme, P. E., Andriopoulos, P., Arianoutsou, M., Bazos, I., Kokkoris, I., Yannitsaros, A., Zikos, A., Augustin, S., Cochard, P. O., ... Zagatti, P. (2010). How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8(3), 135-144.
- Vilà, M., Espinar, J. L., Hejda, M., Hulme, P. E., Jarošík, V., Maron, J. L., Pergl, J., Schaffner, U., Sun, Y., & Pyšek, P. (2011). Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecology Letters*, 14(7), 702-708.
- Vilá, M., Valladares, F., Traveset, A., Castro, P., & Santamaría, L. (2008). ¿Qué son las invasiones biológicas? En *Invasiones biológicas*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Villacide, J. M., & Corley, J. C. (2012). Ecology of the woodwasp *Sirex noctilio*: tackling the challenge of successful pest management. *International Journal of Pest Management*, 58(3), 249-256.
- Vilman T., & Balzaretty V.E. (1994). *Estudios de la composición de aceite esencial de trementina obtenido de Pinus de Chubut*.
- Visser, J. (1986). Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 31(1), 121-144.
- Vitousek, P. M. (1986). Biological invasions and ecosystem properties: can species make a difference? *Ecology of biological invasions of North America and Hawaii*, 163-176.
- Vitousek, P. M., Walker, L. R., Whiteaker, L. D., Mueller-Dombois, D., & Matson, P. A. (1987). Biological invasion by *Myrica faya* alters ecosystem development in Hawaii. *Science*, 238(4828), 802-804.
- Walker, M. M., & Bitterman, M. E. (1985). Conditioned responding to magnetic fields by honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, 157(1), 67-71.
- Wallenmaier, T. (1989). *Wood-boring insects* (R. P. Kahn (ed.); Plant prot). RC Press Boca Raton.
- Wang, L. X., Ren, L. L., Liu, X. B., Shi, J., Wang, J. Z., & Luo, Y. Q. (2019). Effects of endophytic fungi in Mongolian pine on the selection behavior of woodwasp (*Sirex noctilio*) and the growth of its fungal symbiont. *Pest Management Science*, 75(2), 492-505.
- Wardle, D. A., Bardgett, R. D., Callaway, R. M., & Van Der Putten, W. H. (2011). Terrestrial ecosystem responses to species gains and losses. *Science*, 332(6035), 1273-1277. <https://doi.org/10.1126/science.1197479>
- Warrant, E. J. (2001). The design of compound eyes and the illumination of natural habitats. *Ecology of Sensing*, 187-213.
- Waterhouse, D. F., & Sands, D. P. A. (2001). Classical biological control of arthropods in Australia. *Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra*.
- Watkinson, A., Freckleton, R. P., & Dowling, P. M. (2000). Weed invasions of Australian farming systems: from ecology to economics. *The Economics of Biological Invasions*. Edward Elgar Publishing, Cheltenham, 94-116.
- Weiss, M. R. (1997). Innate colour preferences and flexible colour learning in the pipevine swallowtail. *Animal Behaviour*, 53(5), 1043-1052.

- Williamson, M. (1996). *Biological invasions*. Springer Science and Business Media, LLC.
- Williamson, M. (1999). Invasions. *Ecography*, 22(1), 5-12.
- Wong, A. M., Wang, J. W., & Axel, R. (2002). Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell*, 109(2), 229-241.
- Wong, L. K., & Crowden, R. K. (1976). Preliminary studies on the mucus secretion of the wood wasp, *Sirex noctilio* FI Physicochemical and biochemical properties. *Australian journal of biological sciences*, 29(2), 21-32.
- Wyatt, T. D. (2003). *Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste* (Vol. 391). Cambridge University Press.
- Zuk, M., & Kolluru, G. R. (1998). Exploitation of sexual signals by predators and parasitoids. *Quarterly Review of Biology*, 73(4), 415-438.
- Zylstra, K. E., Dodds, K. J., Francese, J. A., & Mastro, V. (2010). *Sirex noctilio* in North America: the effect of stem-injection timing on the attractiveness and suitability of trap trees. *Agricultural and Forest Entomology*, 12(3), 243-250.