

5. Hacia un programa de control biológico de la chinche del eucalipto con *Cleruchoides noackae*

*Towards a Biological Control programme of the bronze bug with *Cleruchoides noackae*.*

Gonzalo Martínez¹¹, Andrés González¹² & Marcel Dicke¹³

(Este artículo es una transcripción adaptada y traducida de Martínez, 2017)

RESUMEN

El control biológico es la herramienta principal para el manejo de plagas forestales. Iniciamos un programa de control biológico para la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* con la avispa parasitoide de huevos *Cleruchoides noackae*. Se importaron huevos parasitados desde una cría masiva en Brasil y se inició una colonia de cría. Las avispas fueron criadas en tubos de plástico con huevos del hospedero y una solución de agua y miel. Durante 30 generaciones, se comparó un conjunto de parámetros de calidad contra estándares establecidos a priori. También evaluamos el efecto de la temperatura sobre el tiempo de desarrollo, la relación entre el aborto de huevos y la exposición previa a *C. noackae*, así como la variación temporal de la razón sexual de los emergentes en una generación dada. A partir de marzo de 2013 y durante varios veranos se realizaron liberaciones a campo en plantaciones comerciales y campos experimentales. Las tasas de emergencia y de supervivencia fueron estables o se incrementaron a lo largo de 30 generaciones. La razón sexual mostró una ligera desviación hacia las hembras. El ciclo se enlenteció a 18° C con respecto a la cría a 22°C pero sin afectar la productividad. El aborto de huevos del hospedero se incrementó como consecuencia de la exposición al parasitoide. La proporción de hembras aumentó a medida que progresó el periodo de emergencia en una generación. Relevamientos a campo en dos sitios revelaron que las avispas sobrevi-

vieron por dos años. Los parasitoides colectados a campo presentaron mejores índices de calidad que los de la cría de laboratorio. Estos resultados confirman que implementar un programa de control biológico de la chinche del eucalipto con *C. noackae* es factible con este protocolo de cría y liberación.

Palabras clave:

Thaumastocoris peregrinus; *Eucalyptus*; liberación inundativa; Thaumastocoridae; Forrestación; Uruguay; calidad de cría.

ABSTRACT

Biological Control is a major tool for forest insect pest management. We initiated a *Biological Control* program for the *Eucalyptus* bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*, with the egg parasitoid *Cleruchoides noackae*. Parasitized eggs were imported from a mass rearing in Brazil, and a rearing colony was set up. The wasp was reared in plastic tubes each containing ten individuals that were offered eggs of the bronze bug and a solution of water and honey. During 30 generations, we assessed rearing quality parameters and compared them against expected quality standards set a priori. We also assessed the effect of temperature on developmental time, as well as the relation between host-egg abortion and parasitization by *C. noackae*, and the sex ratio of the emergent wasps within a single generation. Field releases were made yearly during summers in commercial plantations, starting in March 2013. Survival and emergence rates were either stable or

¹¹ Dr Gonzalo Martínez. Laboratorio de Entomología. Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal. INIA. Tacuarembó. gmartinez@tb.inia.org.uy

¹² Dr Andrés González. Laboratorio de Ecología Química. Facultad de Química. Universidad de la República.

¹³ Prof. Dr Marcel Dicke. Laboratory of Entomology. Wageningen University and Research. Países Bajos

increased throughout 30 generations. Sex ratio was female-biased. Rearing at 18 °C took longer than at 22 °C, but productivity was similar. Host-egg abortion was increased by parasitization. The proportion of females increased as the emergence period progressed. Field surveys in two sites revealed that the wasp survived for two years. Field-collected parasitoids exhibited better quality indices than that of the laboratory rearing. These results confirm that *Biological Control* of the bronze bug with *C. noackae* is feasible with this rearing and release protocol.

Keywords:

Thaumastocoris peregrinus; *Eucalyptus*; inoculative release; Thaumastocoridae; tree plantation; Uruguay; rearing quality.

AGRADECIMIENTOS

La introducción de *C. noackae* a Uruguay fue posible gracias al “Plan regional de vigilancia y control de la chinche de los eucaliptos” (CO-SAVE) y al proyecto cooperativo “Nivelación de las capacidades regionales para el control biológico de la chinche del eucalipto” (PROCI-SUR). Agradecemos al IPEF que hizo posible la importación de *C. noackae* a Brasil y en especial a Edson Iede y a Leonardo Barbosa de EMBRAPA Florestas (Brasil) quienes generosamente ofrecieron entrenamiento en sus sistemas de cría y proveyeron individuos para la fundación de nuestra primera colonia de cría en Uruguay. Reconocemos asimismo a la Sociedad de Productores Forestales por la provisión de sitios de liberación y la información sobre la red de monitoreo. Este estudio no podría haber sido posible sin el trabajo del equipo de cría del Laboratorio de Entomología de INIA Tacuarembó.

INTRODUCCIÓN

La sostenibilidad de las plantaciones de eucaliptos se ha visto amenazada en forma creciente en todo el mundo en las últimas décadas a debido a la invasión de insectos australianos en nuevas áreas plantadas como consecuencia del comercio mundial y del cambio climático (Wingfield *et al.*, 2008;

Paine *et al.*, 2011). Para enfrentar esta amenaza se requiere un fortalecimiento de las medidas de cuarentena y de las estrategias de manejo de plagas a escala global (Wingfield *et al.*, 2015). Sin embargo las técnicas de manejo de plagas que involucran el uso de insecticidas de síntesis están fuertemente restringidas en el marco de esquemas de certificación tales como el Forest Stewardship Council (FSC) debido a los costos económicos y al riesgo que los pesticidas representan para las personas y el ambiente (Willoughby *et al.*, 2009). Las alternativas al uso de insecticidas utilizadas en plantaciones comerciales incluyen las operaciones silvícolas (Klapwijk *et al.*, 2016), el uso de semioquímicos (Nadel *et al.*, 2012b), y el control biológico. Este último representa la mayor contribución al manejo de plagas en los sistemas forestales (Protasov *et al.*, 2007; Garnas *et al.*, 2012; Dittrich-Schröder *et al.*, 2014; Slippers *et al.*, 2015).

En el inicio de un programa de control biológico los esfuerzos de investigación deben canalizarse hacia la producción del agente de control biológico en forma fácil, eficaz y en cantidades adecuadas (Chambers, 1977; Van Lenteren, 2003). La confección de estimadores de calidad es importante para monitorizar el estado de una colonia de cría y lidiar con eventuales problemas tales como la depresión por endocría o la adaptación a las condiciones de laboratorio (Chambers, 1977; Bigler, 1989; Van Lenteren, 2003). Por ejemplo es esencial realizar un monitoreo permanente de la razón sexual de la colonia para evitar el exceso de machos, lo cual podría afectar la sustentabilidad de la cría en el futuro y la eficacia del control por los agentes liberados (Heimpel & Lundgren, 2000). Cuando el agente a ser liberado se encuentra en huevos o pupas parasitados en lugar de ser adultos libres, es crucial poder estimar el número de agentes que serán efectivamente liberados (Van Lenteren, 2003).

Una de las plagas invasivas que afectan plantaciones de eucaliptos en todo el mundo es la chinche del eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero et Dellape (Heteroptera: Thaumastocoridae). Se trata de un pequeño

insecto picosuctor que se alimenta de hojas adultas dentro de los géneros *Eucalyptus* y *Corymbia*, causando clorosis de las hojas, aumento del estrés y en casos severos defoliación o incluso muerte de árboles en pie (Nadel & Noack, 2012). *Cleruchooides noackae* Lin Huber et La Salle (Hymenoptera: Mymaridae) es un parasitoide de huevos de *T. peregrinus* (Lin et al., 2007). Esta avispa es capaz de parasitar huevos de la chinche del eucalipto de hasta tres días (Mutitu et al., 2013). El adulto puede vivir entre dos o tres días si es alimentado con una solución de miel y agua (Mutitu et al., 2013; Souza et al., 2016). Dado el potencial de *C. noackae* como agente de control biológico para la chinche del eucalipto, se instalaron colonias de cría en Sudáfrica (Mutitu et al., 2013) y Brasil (Souza et al., 2016). En Chile se realizó la importación del parasitoide desde Australia, se crió durante dos generaciones y se liberó al ambiente en lo que constituye la primera liberación de *C. noackae* fuera de su rango de distribución natural (Jaques, 2010). El rango térmico óptimo para el desarrollo de *C. noackae* fue determinado entre 15 °C y 25 °C (Mutitu et al., 2013; Souza et al., 2016) pero la duración de los estadios inmaduros a diferentes temperaturas no ha sido reportada.

A los efectos de iniciar un programa de control biológico para la chinche del eucalipto en Uruguay se instaló una colonia de cría de *C. noackae* y se liberaron en forma periódica avispas en el campo. En este trabajo se reportan los resultados luego de 4 años de cría continua y se reporta por primera vez la presencia de poblaciones silvestres de la avispa en Uruguay.

MATERIAL Y MÉTODOS

Primera introducción e instalación de la cría *Cleruchooides noackae* fue introducido por primera vez en Uruguay el 22 de febrero de 2013, procedente de una colonia de cría *in vitro* instalada en EMBRAPA Florestas (Curitiba, Brasil). Se importó un total de 24 tubos, cada uno conteniendo 100 huevos de *T. peregrinus* expuestos a diez avispas adultas de *C. noackae* que correspondían a la octava

generación emergida en Brasil luego de su introducción desde Australia. Se siguieron los procedimientos oficiales de importación y se obtuvieron los permisos de cría y liberación requeridos por la NIMF 3 y los estándares regionales de COSAVE (COSAVE,; FAO, 2005). Esta actividad fue posible en el marco del proyecto PROCISUR. La mitad de los tubos fue inmediatamente liberada en dos plantaciones comerciales de *Eucalyptus* (Sitios 1 y 2, Tabla 1). Los restantes 12 tubos produjeron 180 hembras y 87 machos de *C. noackae* (novena generación), individuos que fueron los fundadores de la colonia de cría. El parasitoide fue criado en su hospedero natural (huevos de *T. peregrinus*) que fueron suministrados a partir de una cría masiva permanente previamente instalada en INIA Tacuarembó, Uruguay ((Martínez et al., 2014). Se seleccionaron huevos de hasta 48 horas conforme la información proporcionada por estudios previos acerca de la edad óptima para parasitismo de *C. noackae* (Mutitu et al., 2013).

Esta colonia de cría de *C. noackae* (a la que nos referiremos como Colonia 1) fue mantenida desde marzo de 2013 a noviembre de 2014 y abarcó las generaciones 10 a 40 siguiendo la cuenta iniciada en Brasil. Las avispas fueron multiplicadas en tubos de plástico (3 cm de diámetro por 7 cm de altura, "tubos de cría") cerrados con una tapa plástica perforada que fue cubierta con tul fino (Figura 1A). Cada tubo de cría fue rellenado con 100 huevos de *T. peregrinus* y 10 individuos adultos recién emergidos de *C. noackae*. Una tira de papel embebida en una solución acuosa de 50 % miel fue colocada como fuente de alimento. Los tubos de cría fueron colocados una vez montados en una cámara de cría (Daihan Wisd SWGC-450) a 22 ± 1 °C, 65 ± 1 % H.R. y fotoperiodo 12:12 h). Los tubos fueron abiertos 8 días después, se contaron las ninfas y las avispas fueron sexadas bajo una lupa (Olympus SZH). A partir del día 18, cada tubo de cría fue inspeccionado para registrar emergencias hasta verificar tres días consecutivos sin emergencia. Las avispas emergidas fueron contadas y sexadas, y asignadas a tubos de cría de la nueva generación.

Una nueva colonia de cría se fundó en 2015 con 547 hembras y 83 machos que emergieron en el laboratorio de oviposuras colectadas en el campo (ver más abajo). Nombramos como primera generación

a las avispas que emergieron de esa generación de fundadores (generación cero). Aquí analizamos datos de las generaciones 0 a 31, a las cuales nos referiremos como **Colonia 2**.

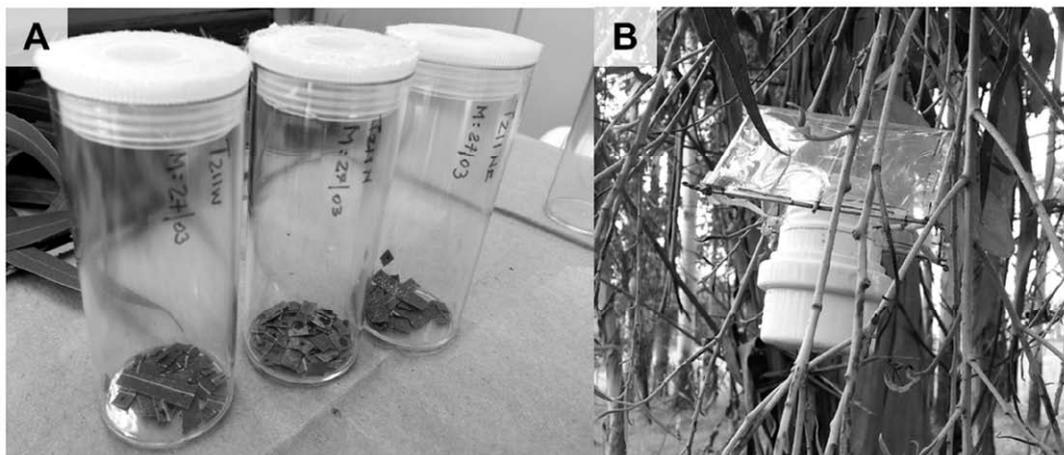


Figura 1. Dispositivos utilizados para la cría y la liberación. A) Tubos de cría de *Cleruchoides noackae*. B) Dispositivo de liberación ubicado en una plantación de *Eucalyptus*.

Efecto de la temperatura

La avispa *C. noackae* ha sido criada a 24 ± 2 °C en Sudáfrica (Mutitu *et al.*, 2013) y a 22 °C en Brasil (Leonardo Barbosa com. pers.). Realizamos un experimento para chequear la emergencia a temperaturas más bajas con el objetivo de facilitar la cría de invierno en condiciones uruguayas. Un grupo de avispas emergidas no mayores a 24 horas fueron separadas en grupos de cinco parejas y colocadas en nuevos tubos de cría. Esos tubos fueron aleatoriamente distribuidos en cámaras de cría a 18 ± 1 °C, 20 ± 1 °C o 22 ± 1 °C, a 65 ± 1 % H.R. y 12 h de fotofase. En el día 10 los tubos fueron abiertos y las ninfas y avispas muertas retiradas. A partir de esa fecha inspeccionamos los tubos diariamente y registramos la emergencia hasta verificar 3 días consecutivos sin nuevos emergentes. En total se utilizaron 13.500 huevos de *T. peregrinus* (4500 huevos por tratamiento en 45 tubos).

Aborto inducido por el parasitoide

Los parasitoides de huevo pueden causar la muerte del hospedero sin llegar a repro-

ducirse, lo que lleva a un número mayor de huevos no eclosionados, abortos, cuando se comparan oviposuras expuestas al parasitoide contra oviposuras no expuestas (Abram *et al.*, 2016). Para investigar el efecto de *C. noackae* sobre la mortalidad de los huevos de *T. peregrinus* comparamos la tasa de aborto, calculada como el inverso de la tasa de eclosión (es decir, la proporción de huevos que no produjeron ni ninfas ni avispas), en un conjunto de tubos de cría conteniendo 100 huevos y cinco parejas de *C. noackae* ("expuestos") contra un conjunto similar de huevos no expuestos al parasitoide. En total se prepararon 5 tubos por tratamiento (500 huevos). El experimento se replicó en las generaciones 30, 35 y 40 de la Colonia 1.

Evolución de la razón sexual durante el periodo de emergencia

A los efectos de evaluar si la disponibilidad de hembras permanece constante durante el periodo de emergencia, en y entre generaciones, dividimos el periodo de emergencia de cada generación en mitades y contamos el número total de hembras y machos emer-

gentes en cada periodo. En caso de un número impar de días dentro de una generación se incluyó el día del medio en la segunda mitad, en todos los casos. El experimento fue repetido 10 veces en generaciones pertenecientes a la Colonia 2.

Liberación a campo

La chinche del eucalipto presenta en Uruguay una dinámica marcadamente estacional, con picos que se registran desde el fin del verano hasta principio del otoño (marzo y abril). Luego de las primeras heladas se nota una disminución marcada en las poblaciones, que vuelve al insecto indetectable hasta diciembre (Martínez & Gómez, 2014; Martínez *et al.*, 2014). Avispas de la colonia de cría fueron liberadas en forma periódica en el campo durante el verano a partir de marzo de 2013. Para seleccionar los sitios de liberación utilizamos información de la red nacional de trampas amarillas (Martínez & Gómez, 2014). Se seleccionaron sitios de la red de monitoreo donde se registraran aumentos en las capturas de *T. peregrinus* y esa información se confirmó en consulta directa con los productores *in situ*.

Un grupo de hasta 15 tubos de cría cercanos al día 19 (o sea, justo antes del inicio de las emergencias) fueron transportados a los sitios seleccionados en una conservadora con frío. En el sitio de liberación seleccionamos árboles con oviposturas frescas de la chinche del eucalipto. Los huevos parasitados se transfirieron de los tubos de cría a un dispositivo de liberación que consiste de una cámara donde se alojan los huevos con una abertura superior cubierta con malla para evitar que hormigas y otros depredadores puedan ingresar (pero que permita salir a los parasitoides). Un techo de plástico transparente de dos aguas protege el punto de salida de la lluvia. Tres dispositivos de liberación fueron colgados en árboles seleccionados en cada sitio (Figura 1B), y revisitados al año siguiente durante el verano. En la segunda visita colectamos oviposturas de *T. peregrinus* de los árboles donde se colgaron dispositivos de liberación, así como de árboles adyacentes

si se veían huevos en ellos. Las muestras de huevos fueron procesadas en el laboratorio; contamos los huevos no eclosionados y los colocamos en tubos de cría en similares condiciones a las utilizadas en la colonia. Revisamos diariamente los tubos para verificar emergencias y los descartamos luego de un mes.

Análisis de los datos

Para estimar la calidad de la cría calculamos tres índices para cada generación: el porcentaje de emergencia (número de avispas emergidas en relación al total de huevos ofrecidos para parasitar), el porcentaje de supervivencia (número de individuos vivos en relación al total de parasitoides emergidos) y el porcentaje de hembras (número de hembras emergidas en relación al total de avispas emergidas). En la Colonia 1, las avispas emergentes fueron sexadas en una sub-muestra del total de tubos de cría (con un mínimo de 30 tubos por generación). En la Colonia 2, y por practicidad, todos los individuos emergidos en un día dado fueron sexados al final del día (luego de coleccionar todas las avispas emergidas en todos los tubos).

Establecimos estándares mínimos de calidad *a priori* de 20 % para emergencia, 80% para supervivencia y 50% para hembras, basados en información sobre crías *in vitro* en Brasil y Chile. Calculamos intervalos de confianza del 95% para estos índices de calidad siguiendo el procedimiento recomendado por Wajnberg (2003), contra los cuales se compararon los estándares de calidad. También calculamos estos índices para las oviposturas colectadas en el campo, en los casos en los que se verificó emergencia de avispas.

Evaluamos el primer día de emergencia de parasitoides a 18° C, 20°C y 22°C mediante comparaciones pareadas con un test de suma de rangos de Wilcoxon y valores de *p* ajustados con una corrección de Bonferroni (R Development Core Team, 2009). Para calcular las diferencias en la cosecha de avispas a diferentes temperaturas compara-

mos la proporción de avispas vivas sobre el número de huevos parasitados y realizamos comparaciones pareadas con un test de independencia de G y valores de p ajustados mediante una corrección de Bonferroni (MacDonald & Gardner, 2000).

Las tasas de aborto en tubos expuestos versus no expuestos, así como la proporción de hembras en la primera y la segunda mitad de la generación fueron arregladas como tablas de contingencia de 2x2 y comparadas mediante un test de Cochran-Mantel-Haenszel. Se probó la hipótesis nula de que las dos variables nominales (aborto vs. exposición y sexo vs. mitad de la generación, respectivamente) eran condicionalmente independientes en cada generación (Zhang & Boos, 1997). La homogeneidad de las razones en ambos casos fue previamente chequeada con un test de Breslow-Day.

RESULTADOS

Calidad de las colonias de cría

La dinámica de los índices de calidad a través de las generaciones y en ambas colonias de cría se resume en la figura 2. En general los parámetros estimados se mantuvieron

dentro de los estándares establecidos a priori. La supervivencia presentó una variación considerable en la Colonia 1 pero mejoró en la Colonia 2 con valores por encima del 80% en todas menos una generación (figura 2). El porcentaje de emergencia se mantuvo entre 20 y 30 % después de la generación 21 en la Colonia 1. En contraste la Colonia 2 presentó fluctuaciones más altas en el porcentaje de emergencia, aunque éste se mantuvo por encima del 20% a partir de la generación 18. Solo 47 tubos de un total de 1793 en la Colonia 1 presentaron valores de emergencia por encima de 50 avispas. Debido a una limitación en el número de huevos de hospedero y basados en el hecho que la mitad de los huevos en los tubos permanecieron no parasitados se decidió disminuir el número de huevos por tubos de 100 a 50 a partir de la generación 23 de la Colonia 2. Visto que esta disminución no afectó el comportamiento de los índices restantes se decidió mantener esta proporción en las generaciones subsiguientes. La razón sexual fue ligeramente sesgada hacia las hembras (figura 2). El porcentaje de hembras se mantuvo en forma significativa por encima del 50 % en todas las generaciones excepto una (18) en la Colonia 1, y dos generaciones (10, 15) en la **Colonia 2**.

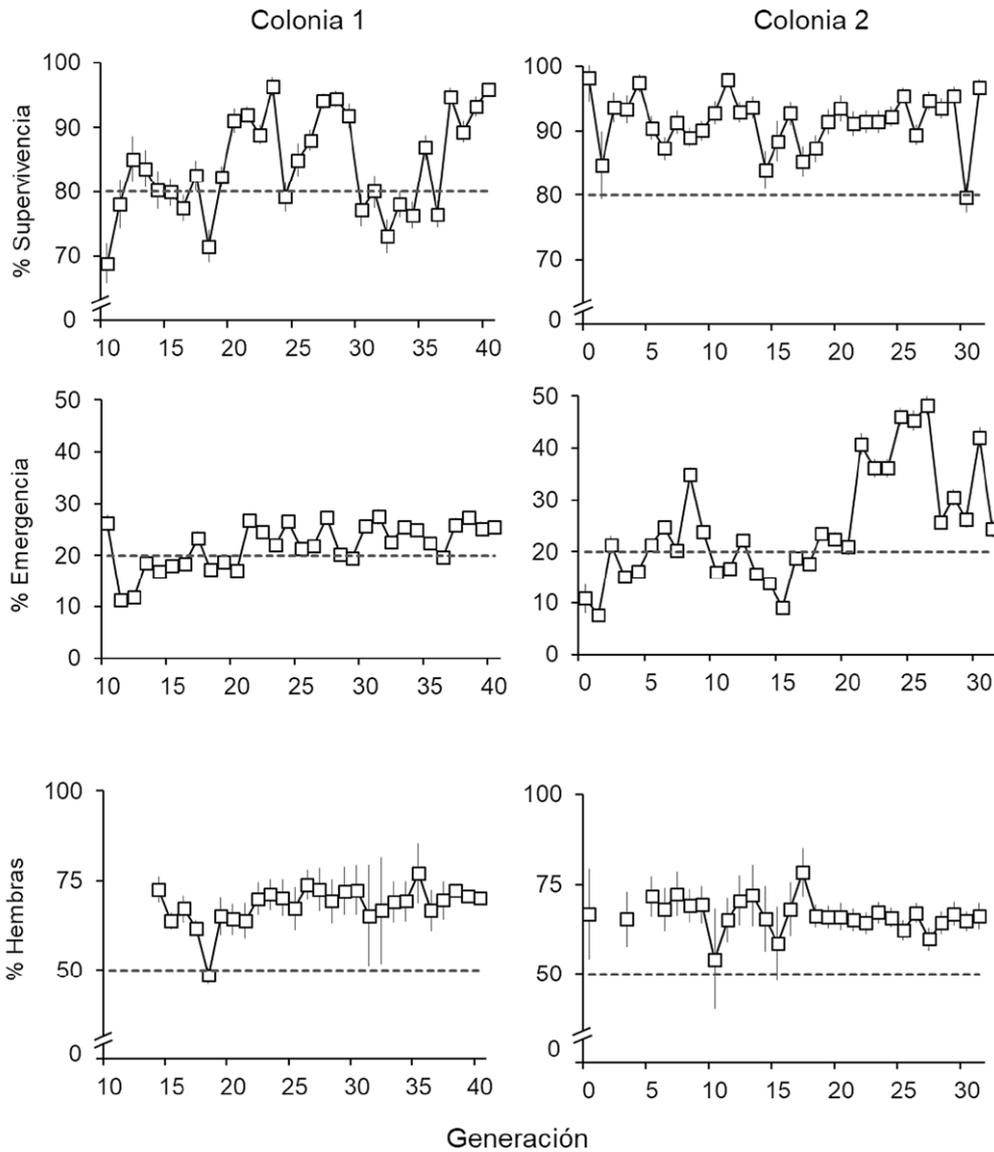


Figura 2. Índices de calidad. Porcentaje de cría viva, porcentaje de avispas emergentes y porcentaje de hembras (\pm intervalo de confianza del 95%) por generación en las dos colonias de cría de *Cleruchoides noackae* (izquierda: primera colonia, derecha: segunda colonia). Líneas punteadas representan los estándares de calidad establecidos a priori.

Temperatura

La temperatura afectó el inicio de las emergencias de *C. noackae*. La variación para cada temperatura dada fue muy baja. La emergencia de parasitoides comenzó en el día 19 ± 0.9 (media \pm desviación estándar) a 22°C , en el día 24 ± 0.9 a 20°C y en el

día 27 ± 0.9 a 18°C (Test de suma de rangos de Wilcoxon, valores de p corregidos en todas las comparaciones < 0.001). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de avispas cosechadas a los tres diferentes valores de temperatura (G-test = 5.16, 2 grados de libertad, $p = 0.07$, Figura 3).

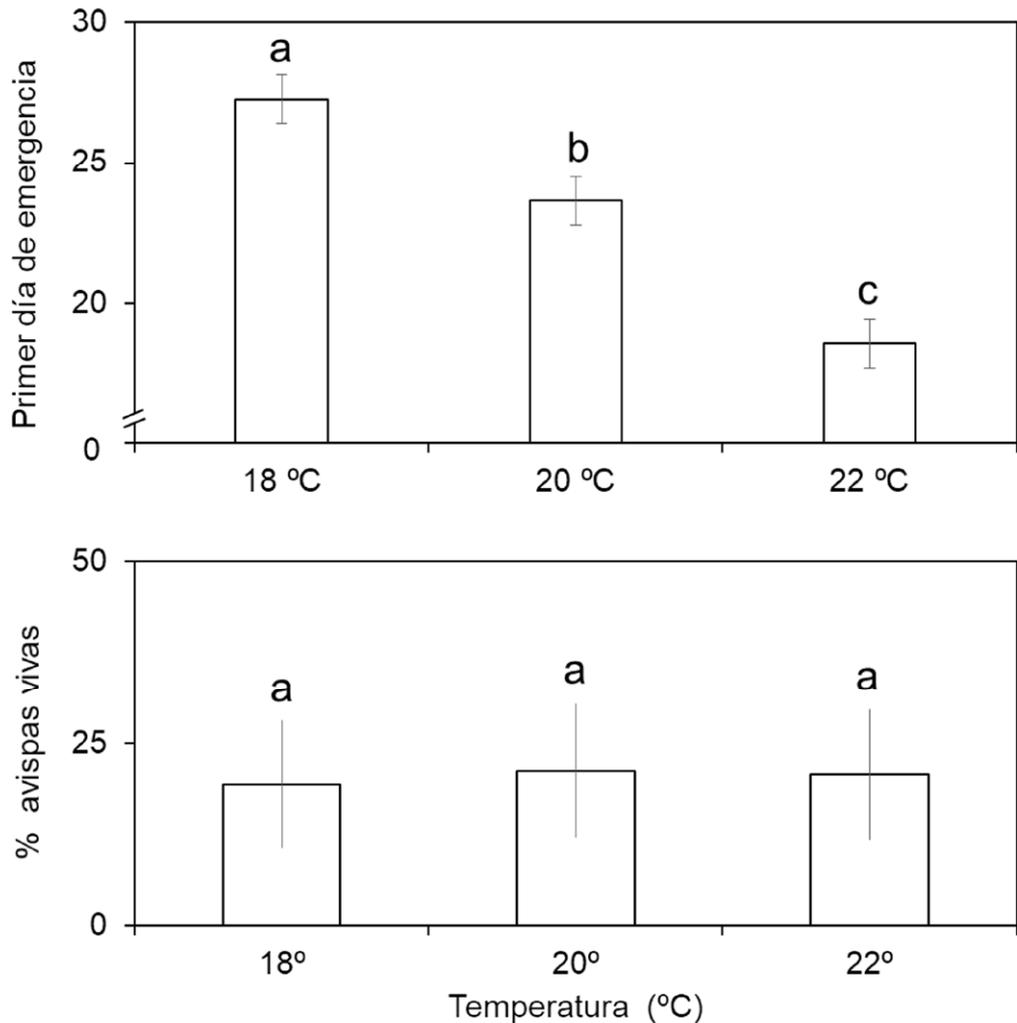


Figura 3. Efecto de la temperatura. Primer día de la emergencia (media \pm desviación estándar) y porcentaje de avispas vivas (\pm intervalo de confianza del 95%) a diferentes temperaturas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos a $\alpha = 0.05$ (Test de suma de rangos de Wilcoxon para el primer día, Test G de independencia para el % avispas vivas).

Aborto inducido por el parasitoide

Las tasas de aborto fueron significativamente diferentes entre huevos expuestos y no expuestos al parasitoide (Cochran-Mantel-

Haenszel: $X^2 = 30.399$, 1 grado de libertad, $p < 0.001$, Figura 4). La razón entre tratamientos permaneció constante a través de las generaciones calculadas (Figura 4; Breslow-Day: $X^2 = 0.083$, 2 grados de libertad, $p = 0.96$).

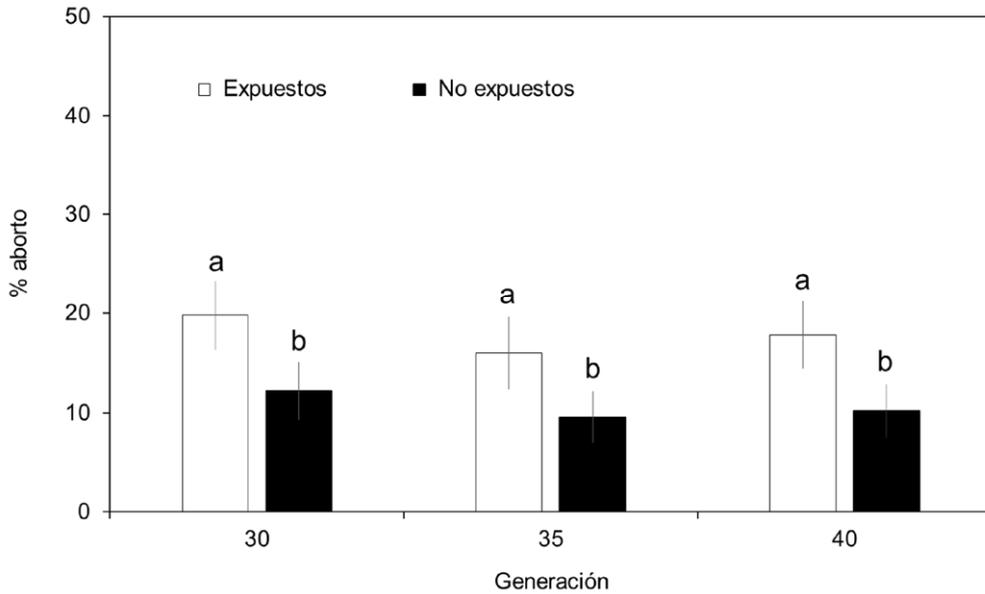


Figura 4. Aborto inducido por parasitismo a *C. noackae*. Porcentaje de huevos abortados de *Thaumastocoris peregrinus* (\pm intervalo de confianza del 95%) expuestos o no expuestos a parasitación por *Cleruchoides noackae*. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos y a través de las generaciones a $\alpha = 0.05$ (Test de X² de Cochran-Mantel-Haenszel).

Evolución de la razón sexual durante el periodo de emergencia

La proporción de hembras fue mayor durante la segunda mitad del periodo de emergencia dentro y entre generaciones (Cochran-

Mantel-Haenszel: X² = 18.322, 1 grado de libertad, p < 0.001, Figura 5). La razón entre tratamientos permaneció homogénea a través de las generaciones estudiadas (Breslow-Day: X² = 3.0759, 2 grados de libertad, p = 0.96).

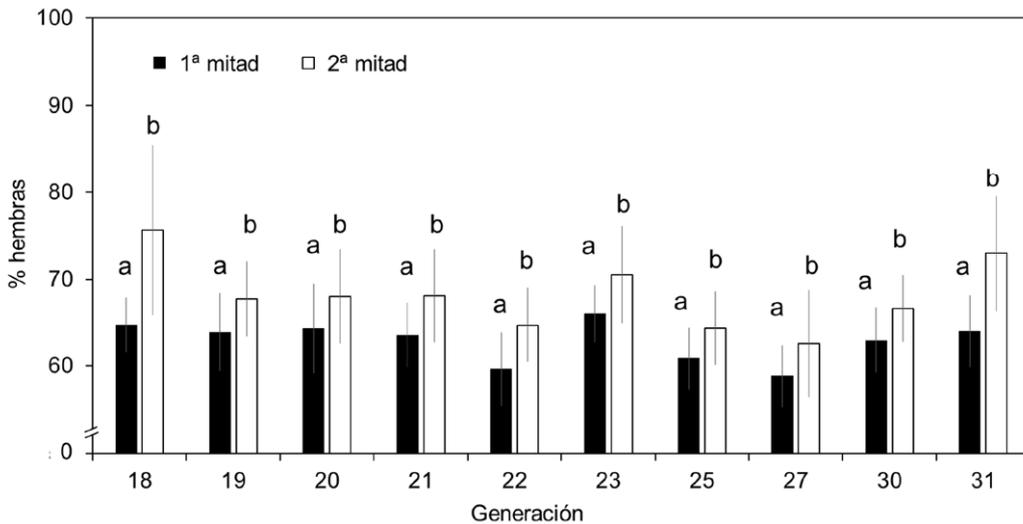


Figura 5. Evolución de la razón sexual durante el periodo de emergencia en diferentes generaciones. Porcentaje de hembras porcentaje of females of *C. noackae* (\pm intervalo de confianza del 95%) para avispas emergidas en la primera mitad (barras negras) o en la segunda mitad (barras blancas) de cada generación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos a $\alpha = 0.05$ (Cochran-Mantel-Haenszel X²).

Liberación a campo

Huevos parasitados fueron liberados en siete sitios en el campo entre 2013 y 2015 (Figura 6). El verano de 2014 fue extremadamente tormentoso, lo cual afectó en gran medida las poblaciones de *T. peregrinus* tal como se reflejó en la red de trampas amarillas (Martínez & Gómez, 2014). Estas condiciones retrasaron la primera campaña de monitoreo. Durante 2014, se relevaron los sitios 1 a 4 a fines de marzo y se realizaron dos nuevas liberaciones en abril (sitios 5 y 6). En mayo del mismo año se revisitaron los sitios 2 a 4 debido a una mejoría en las condiciones ambientales y a la permanencia de poblaciones de *T. peregrinus* en el campo. Durante este relevamiento se recuperó por primera vez *C. noackae* del sitio 3 (Cuadro 1). Se revisitaron los sitios 1 a 6 en 2015 pero no se encontraron huevos de *T. peregrinus* en la mayoría de los sitios por lo que no se realizaron nuevas liberaciones durante esa campaña.

No obstante se lograron coleccionar oviposturas del sitio 3, del cual se recuperaron avispas una vez más. En 2016 se recuperaron avispas por tercera vez del sitio 3 y por primera vez del sitio 4, en febrero y marzo, respectivamente. De marzo a mayo de 2016 se realizaron liberaciones adicionales en un nuevo sitio (7).

Las avispas emergidas de los huevos colectados del campo exhibieron tasas de supervivencia *in vitro* por encima del 80% en todas las muestras excepto las colectadas en el sitio 3 en 2014 (646 huevos en 7 tubos). Las muestras que fueron tomadas del sitio 3 en 2015 presentaron una emergencia más alta ($51.7 \pm 1.8\%$) que en previas muestras de campo y que en condiciones de laboratorio. Tal como se mencionó anteriormente utilizamos estas avispas para fundar la Colonia 2. Las avispas emergentes de todas las colectas a campo presentaron una proporción de hembras de 50% o ligeramente superior (Cuadro 1).

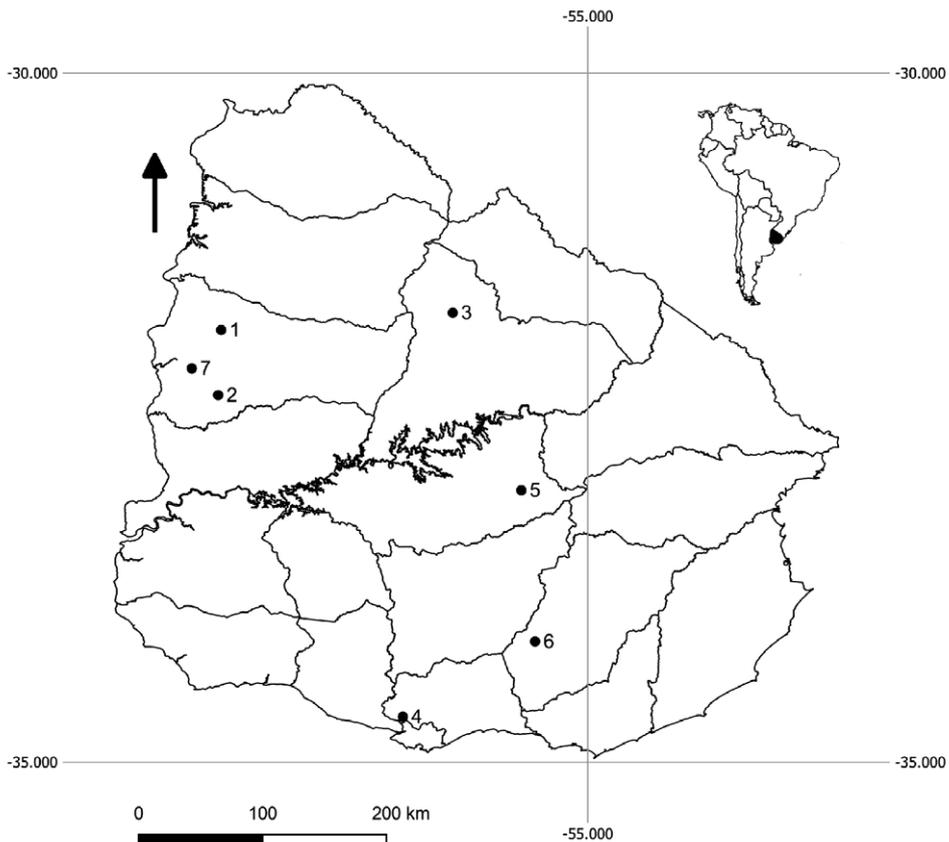


Figura 6. Sitios de liberación. Ubicación de los sitios de liberación de *Cleruchooides noackae*. La flecha indica el Norte.

Cuadro 1. Resumen de datos de liberaciones de campo de *Cleruchoides noackae* (se indica la media \pm el intervalo de confianza del 95% para cada índice).

Fecha (m/a)	Sitio	Especie	Nº de liberaciones	Nº de huevos parasitados liberados	Nº de visitas de monitoreo	Huevos de <i>T.peregrinus</i> colectados (año)	¿Recuperación?	% emergencia (año)	% hembras (año)	% supervivencia (año)
03/2013	1	<i>E. dunnii</i>	2	500 500	3	250 (2014) N.E. (2015)	No	-	-	-
03/2013	2	<i>E. benthamii</i>	2	500 500	3	N.E. (2014) N.E. (2015)	No	-	-	-
11/2013	3	<i>E. tereticornis</i> <i>E. maidenii</i>	2	1000 1000	2	646 (2014)	Sí	2.4 \pm 0.5 (2014)	73.8 \pm 9.5 (2014)	38.1 \pm 14.9 (2014)
02/2014	3	<i>E. tereticornis</i> <i>E. maidenii</i>	3	1000 1000 1000	2	2021 (2015) 335 (2016)	Sí	51.7 \pm 1.8 (2015) 35.5 \pm 11.7 (2016)	59.9 \pm 1.5 (2015) 58.8 \pm 15.0 (2016)	85.5 \pm 0.6 (2015) 100 \pm 19.6 (2016)
02/2014	4	<i>E. globulus</i>	2	1000 1000	3	N.E. (2014) 1830 (2016)	Sí	26.1 \pm 2.6 (2016)	50.0 \pm 1.1 (2016)	80.5 \pm 2.8 (2016)
04/2014	5	<i>E. grandis</i>	1	1500	1	N.E. (2015)	No	-	-	-
04/2014	6	<i>E. viminalis</i>	1	1200	1	N.E. (2015)	No	-	-	-
03/2016	7	<i>E. benthamii</i>	3	1200 1200 1200	-	-	No	-	-	-

Discusión

El protocolo de cría desarrollado para *Cleruchoides noackae* presentado en este estudio nos permitió mantener una colonia viable de la avispa por dos años, sin cambios significativos en los parámetros de calidad en relación a los estándares basados en la experiencia de cría en Brasil y Chile. Las avispas procedentes de la cría periódicamente liberadas en el campo fueron capaces de colonizar al menos dos sitios y reproducirse en número suficiente como para iniciar una nueva colonia de cría, exclusivamente a partir de individuos colectados en el campo. Estos datos demuestran que es factible mantener una colonia de cría de este parasitoide en el contexto de un programa de control biológico para la chinche del eucalipto.

Cría en laboratorio

Si tomamos en cuenta la información obtenida de los índices de calidad, la preparación de 60 tubos por generación produciría en el

peor escenario 570 hembras vivas por 3000 huevos, lo cual sería suficiente para mantener la cría durante el invierno cuando no se realizan liberaciones. En verano, el escalamiento de la cría a 100 tubos proveería de 960 hembras por 5000 huevos lo cual permitiría la liberación a campo. Las tareas diarias en la cría incluyen la preparación de tubos de cría y el conteo de las avispas emergidas. Dos personas trabajando 30 horas por semana pueden cumplir con las actividades relacionadas con la cría durante los periodos de emergencia.

Nosotros establecimos como objetivos de la cría obtener una emergencia del 20% o más, al menos 50% de hembras y una supervivencia por encima del 80 %, tomando como base los parámetros estimados en la cría de EMBRAPA de la cual fueron obtenidos los individuos fundadores de la colonia inicial. La supervivencia mejoró en la segunda colonia iniciada a partir de individuos colectados a campo. Un mejor manejo del sistema luego de dos años de experiencia podría explicar esta mejora.

De acuerdo a nuestros resultados la emergencia en promedio de 20-30 avispas en una base de 100 huevos por tubo de cría implica que alrededor de la mitad de los huevos quedan sin parasitar (si consideramos un promedio de 20 abortos). La decisión de reducir el número de huevos a 50 por tubo nos permitió economizar esfuerzos sin perder productividad. De esta forma el porcentaje de emergencia aumentó al doble luego de realizado este cambio (es decir, el número de emergentes por tubo se mantuvo igual), mientras que los restantes índices no experimentaron cambios, o incluso mejoraron.

Aunque en algunos casos las condiciones de cría pueden afectar la razón sexual en Mymaridae (Heimpel & Lundgren, 2000), nuestros resultados muestran una razón sexual ligeramente sesgada hacia las hembras que permaneció constante en todas las generaciones. Los datos obtenidos de poblaciones de campo muestran una proporción de hembras desde ca. 50% a moderadamente sesgada hacia la hembra. Poblaciones con este sesgo hacia las hembras han sido reportadas en colonias de cría de otras especies de Mymaridae (Boivin, 1988; Chen *et al.*, 2006), aunque Mutitu *et al.* (2013) reportaron una población ligeramente sesgada hacia los machos (aunque no significativamente diferente al 50%) en una colonia de cría de *C. noackae*. En nuestro estudio solo una de 60 generaciones presentó una razón sexual sesgada hacia los machos y no se encontró este sesgo en ninguna de muestras de campo. Dado que *C. noackae* se reproduce por partenogénesis arrenótoca (haplodiploide) (Mutitu *et al.*, 2013) como es el caso en otros mimáridos, las hembras son capaces de controlar la razón sexual de la progenie en función de la calidad de los parches colonizados (Van Baaren *et al.*, 1999).

El manejo de la depresión por endogamia es un desafío importante en la cría de insectos, particularmente en colonias de mediana escala (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Nuestro estudio que abarca más de 30 generaciones continuas y dos colonias diferentes sugiere que *C. noackae* presenta una alta to-

lerancia a condiciones de endogamia en cría in vitro, condición que ha sido observada en otros parasitoides (Quaglietti *et al.*, 2017). En el caso de *C. noackae* esto puede deberse a la biología de esta minúscula avispa con limitadas capacidades de dispersión que resulta en pequeñas poblaciones de la avispa con un limitado flujo génico entre ellas (Nadel *et al.*, 2012a). De todos modos futuros estudios deberían evaluar otros parámetros de historia de vida y potenciales cambios en los mismos debido a la cría continua. Tomando en cuenta nuestros resultados es aconsejable instalar una nueva colonia con individuos silvestres al menos una vez cada dos años para evitar adaptación a las condiciones de laboratorio (Sørensen *et al.*, 2012).

Efecto de la temperatura

Conforme lo esperado la temperatura afectó la duración del ciclo de vida de *C. noackae* pero ni la supervivencia ni la emergencia se vieron afectadas por la cría a temperaturas inferiores a 22 °C. El rango térmico óptimo para *C. noackae* se da entre 15 °C y 25 °C de acuerdo a estudios previos (Souza *et al.*, 2016), y la cría a 22 °C permite la cosecha a intervalos de 19 días. Nosotros probamos dos temperaturas por debajo de la temperatura usual de cría de 22°C, a efectos de optimizar la cría invernal, cuando la demanda de avispas disminuye. Basados en nuestros resultados escogimos 18 °C como la temperatura para cría invernal ya que permite la cosecha de una generación cada 27 días (cosecha mensual) sin reducción en la emergencia o la supervivencia.

Aborto inducido por el parasitoide

El aborto del hospedero inducido por el parasitoide puede constituir un servicio de control biológico adicional provisto por los parasitoides de huevo (Abram *et al.*, 2016). Nuestros resultados muestran que bajo las condiciones de cría utilizadas en el presente estudio una media de 20% de los huevos puestos por la chinche del eucalipto no eclosionan y que este porcentaje es significativamente aumentado luego de la exposición a *C. noackae*.

Evolución de la razón sexual durante el periodo de emergencia

En el presente estudio observamos en forma consistente un aumento en la proporción sexual de las hembras en la segunda mitad de la generación, lo cual sugiere que los machos tienden a emerger antes que las hembras. En sistemas reproductivos donde el apareamiento entre hermanos u otras formas de reproducción no panmíctica son comunes, la estructura reproductiva resultante se define como "competencia por parejas locales" (Hamilton, 1967) la cual selecciona a favor de razones sexuales sesgadas hacia la hembra, como se observa para *C. noackae*. Bajo esta condición reproductiva la emergencia temprana le confiere ventajas competitivas a los machos para el acceso a un número mayor de hembras (Hamilton, 1967; Werren, 1980), particularmente en especies con un periodo de vida adulta relativamente corto, tal como sucede en esta especie. La observación reiterada de avispas copulando en forma inmediata a la emergencia realizada durante este estudio así como por Mutitu *et al.* (2013) le da soporte adicional a la teoría de competencia por parejas locales.

Liberación a campo

Reportamos en este estudio la recuperación exitosa a campo por primera vez de individuos silvestres de *C. noackae* en dos sitios independientes y en forma reiterada por tres años. Basados en estos resultados podemos confirmar el establecimiento de una población silvestre de *C. noackae* en Uruguay.

La liberación de parasitoides y su posterior seguimiento se vieron muy afectados por las condiciones climáticas adversas. La ocurrencia de dos periodos de verano con eventos importantes de precipitación perjudicaron las poblaciones de *T. peregrinus* a tal punto que no fue posible recuperar huevos en la mayoría de los sitios releva-

dos. Los sitios de los que se logró recuperar poblaciones silvestres están ubicados en estaciones experimentales de INIA lo cual permitió utilizar elevadores mecánicos para coleccionar huevos a mayores alturas. Es posible por lo tanto que existan poblaciones silvestres establecidas en otros sitios pero a las que no se ha podido alcanzar con la colecta manual y que el éxito relativo de estos sitios se deba simplemente a un mayor esfuerzo de muestreo. Además el hecho de haber colectado *C. noackae* en el sitio 4 dos años después de haber realizado liberaciones implica que las avispas consiguieron mantener una población silvestre sin nuevas introducciones desde 2014 a 2016. Con la sola excepción de la primera recuperación del sitio 4, la supervivencia de los individuos silvestres en el laboratorio se mantuvo por encima de 80%, la emergencia por encima del 20% y más de la mitad de los individuos recuperados fueron hembras. Estos resultados sugieren que hay buenas oportunidades para el establecimiento de poblaciones silvestres de *C. noackae* en nuestras condiciones ambientales.

Consideraciones finales

Luego de cuatro años consecutivos de cría y liberación de *C. noackae*, hemos establecido un protocolo de cría que permite una producción estable y la liberación a campo de parasitoides, y hemos logrado instalar poblaciones silvestres del parasitoide en al menos dos sitios separados, lo cual asegura la continuidad de la producción. Los próximos pasos involucran la optimización de los esquemas de liberación y la evaluación de la eficacia de *C. noackae* como agente de control biológico de la chinche del eucalipto en Uruguay. La mejora de tanto las condiciones de cría como del éxito de las liberaciones requiere estudios adicionales sobre los mecanismos de búsqueda y dispersión del parasitoide, y el desarrollo de métodos eficaces de monitoreo para la plaga y el parasitoide.

REFERENCIAS

- ABRAM P.K., BRODEUR J., BURTE V., BOIVIN G.** 2016. Parasitoid-induced host egg abortion: An underappreciated component of *Biological Control* services provided by egg parasitoids. *Biological Control* 98: 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.002>.
- BIGLER F.** 1989. Quality assessment and control in entomophagous insects used for *Biological Control*. *Journal of Applied Entomology* 108 (1–5): 390–400. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1989.tb00473.x>.
- BOIVIN G.** 1988. Laboratory rearing of *Anaphes sordidatus* (Hym.: Mymaridae) on carrot weevil eggs (Col.: Curculionidae). *Entomophaga* 33 (2): 245–248. <https://doi.org/10.1007/BF02372660>.
- CHAMBERS D.L.** 1977. Quality control in mass rearing. *Annual Review of Entomology* 22 (1): 289–308.
- CHARLESWORTH D., CHARLESWORTH B.**, 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237–268.
- CHEN W., LEOPOLD R.A., MORGAN D.J.W., HARRIS M.O.** 2006. Development and reproduction of the egg parasitoid, *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera: Mymaridae), as a function of temperature. *Environmental Entomology* 35 (5): 1178–1187. [https://doi.org/10.1603/0046-225-X\(2006\)35\[1178:DAROTE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225-X(2006)35[1178:DAROTE]2.0.CO;2).
- COSAVE.** Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur.
- DITTRICH-SCHRÖDER G., HARNEY M., NESER S., JOFFE T., BUSH S., HURLEY B.P., WINGFIELD M.J., SLIPPERS B.** 2014. Biology and host preference of *Selitrichodes neseri*: A potential *Biological Control* agent of the *Eucalyptus* gall wasp, *Leptocybe invasa*. *Biological Control* 78: 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.07.004>.
- FAO.** 2005. *International Standards for Phytosanitary Measures 1 to 24*. FAO, Rome.
- GARNAS J.R., HURLEY B.P., SLIPPERS B., WINGFIELD M.J.** 2012. *Biological Control* of forest plantation pests in an interconnected world requires greater international focus. *International Journal of Pest Management* 58 (3): 211–223. <https://doi.org/10.1080/09670874.2012.698764>.
- HAMILTON W.D.** 1967. Extraordinary sex ratios. *Science* 156 (3774): 477–488. <https://doi.org/10.1126/science.156.3774.477>.
- HEIMPEL G.E., LUNDGREN J.G.** 2000. Sex ratios of commercially reared *Biological Control* agents. *Biological Control* 19 (1): 77–93. <https://doi.org/10.1006/bcon.2000.0849>.
- JAQUES L.** 2010. *Cuarentena y masificación de Cleruchoidea noackae* Lin & Hubert (Hymenoptera: Mymaridae) parasitoides de huevos de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellape (Hemiptera: Thaumastocoridae). SAG, Santiago de Chile.
- KLAPWIJKM.J., BYLUNDH., SCHROEDER M., BJÖRKMAN C.** 2016. Forest management and natural biocontrol of insect pests. *Forestry* 89 (3): 253–262. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpw019>.
- LIN N.Q., HUBER J.T., LA SALLE J.** 2007. The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Zootaxa* 1596: 1–111.
- MACDONALD P.L., GARDNER R.C.** 2000. Type I error rate comparisons of post hoc procedures for I J Chi-square tables. *Educational and Psychological Measurement* 60 (5): 735–754. <https://doi.org/10.1177/00131640021970871>.
- MARTÍNEZ G.** 2017. Mothers in the woods: Multitrophic interactions and oviposition preference in the bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*, a pest of *Eucalyptus*. PhD Thesis. Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Netherlands.

MARTÍNEZ G., GÓMEZ D. 2014. *Monitoreo de trampas amarillas*. INIA - CECOPE, Tacuarembó.

MARTÍNEZ G., LÓPEZ L., CANTERO G., GONZÁLEZ A., DICKE M. 2014. Life-history analysis of *Thaumastocoris peregrinus* in a newly designed mass rearing strategy. *Bulletin of Insectology* 67 (2): 199–205.

MUTITU E.K., GARNAS J.R., HURLEY B.P., WINGFIELD M.J., HARNEY M., BUSH S.J., SLIPPERS B. 2013. Biology and rearing of *Cleruchoidea noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid for the *Biological Control of Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Journal of Economic Entomology* 106 (5): 1979–1985. <https://doi.org/10.1603/EC13135>.

NADEL R.L., NOACK A.E. 2012. Current understanding of the biology of *Thaumastocoris peregrinus* in the quest for a management strategy. *International Journal of Pest Management* 58 (3): 257–266. <https://doi.org/10.1080/09670874.2012.659228>.

NADEL R.L., WINGFIELD M., SCHOLEM M., LAWSON S., NOACK A., NESER S., SLIPPERS B. 2012a. Mitochondrial DNA diversity of *Cleruchoidea noackae* (Hymenoptera: Mymaridae): a potential *Biological Control* agent for *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). *BioControl* 57 (3): 397–404. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9409-z>.

NADEL R.L., WINGFIELD M.J., SCHOLEM M.C., LAWSON S.A., SLIPPERS B. 2012b. The potential for monitoring and control of insect pests in Southern Hemisphere forestry plantations using semiochemicals. *Annals of Forest Science* 69 (7): 757–767. <https://doi.org/10.1007/s13595-012-0200-9>.

PAINÉ T.D., STEINBAUER M.J., LAWSON S.A. 2011. Native and exotic pests of *Eucalyptus*: A worldwide perspective. *Annual Review of Entomology* 56: 181–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021118>.

PROTASOV A., BLUMBERG D., BRAND D., LA SALLE J., MENDEL Z. 2007. *Biological Control of the Eucalyptus gall wasp Ophelimus maskelli* (Ashmead): Taxonomy and biology of the parasitoid species *Closterocerus chamaeleon* (Girault), with information on its establishment in Israel. *Biological Control* 42 (2): 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.002>.

QUAGLIETTI B., TAMISIER L., GROUSIER G., FLEISCH A., LE GOFF I., RIS N., KREITER P., FAUVERGUE X., MALAUSA T. 2017. No inbreeding depression in laboratory-reared individuals of the parasitoid wasp *Allotropa burrelli*. *Ecology and Evolution* 7 (3): 964–973. <https://doi.org/10.1002/ece3.2643>.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2009. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.

SLIPPERS B., HURLEY B.P., WINGFIELD M.J. 2015. Sirex woodwasp: A model for evolving management paradigms of invasive forest pests. *Annual Review of Entomology* 60 (1): 601–619. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021118>.

SØRENSEN J.G., ADDISON M.F., TERBLANCHE J.S. 2012. Mass-rearing of insects for pest management: Challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. *Crop Protection* 38: 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.03.023>.

SOUZA A.R. DE, CANDELARIA M.C., BARBOSA L.R., WILCKEN C.F., CAMPOS J.M., SERRÃO J.E., ZANUNCIO J.C. 2016. Longevity of *Cleruchoidea noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), with various honey concentrations and at several temperatures. *Florida Entomologist* 99 (1): 33–37. <https://doi.org/10.1653/024.099.0107>.

VAN BAAREN J., LANDRY B.L., BOIVIN G. 1999. Sex allocation and larval competition in a superparasitizing solitary egg parasitoid: competing strategies for an optimal sex ratio. *Functional Ecology* 13 (1): 66–71. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00283.x>.

VAN LENTEREN J.C. (ED.). 2003. Quality control and production of *Biological Control* agents: theory and testing procedures. CABI Pub, Wallingford, Oxon, UK ; Cambridge, MA.

WAJNBERG E. 2003. Basic statistical methods for quality control workers. In: Van Lenteren JC, ed. Quality control and production of *Biological Control* agents. CABI, pp. 305–314.

WERREN J.H. 1980. Sex ratio adaptations to local mate competition in a parasitic wasp. *Science* 208 (4448): 1157–1159.

WILLOUGHBY I., WILCKEN C.F., IVEY P., O'GRADY K., KATTO F. 2009. FSC Guide to integrated pest, disease and weed management in FSC certified forests and plantations. Forest Stewardship Council.

WINGFIELD M.J., BROCKERHOFF E.G., WINGFIELD B.D., SLIPPERS B. 2015. Planted forest health: The need for a global strategy. *Science* 349 (6250): 832–836.

WINGFIELD M.J., SLIPPERS B., HURLEY B., COUTINHO T., WINGFIELD B., ROUX J. 2008. Eucalypt pests and diseases: growing threats to plantation productivity. *Southern Forests: a Journal of Forest Science* 70 (2): 139–144. <https://doi.org/10.2989/SOUTH.FOR.2008.70.2.9.537>.

ZHANG J., BOOS D.D. 1997. Generalized cochrane-mantel-haenszel test statistics for correlated categorical data. *Communications in Statistics - Theory and Methods* 26 (8): 1813–1837. <https://doi.org/10.1080/03610929708832016>.