

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**ESTUDIO DEL DESEMPEÑO DE ÁFIDOS (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EN
CULTIVARES (QUIÑEQUELI INIA, REDQUELI INIA, SUPERQUELI INIA) Y
LÍNEAS EXPERIMENTALES DE TRÉBOL ROSADO (*Trifolium pratense* L.)**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

BETANIA PACHECO AGUILERA

TEMUCO-CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**ESTUDIO DEL DESEMPEÑO DE ÁFIDOS (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EN
CULTIVARES (QUIÑEQUELI INIA, REDQUELI INIA, SUPERQUELI INIA) Y
LÍNEAS EXPERIMENTALES DE TRÉBOL ROSADO (*Trifolium pratense* L.)**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

BETANIA PACHECO AGUILERA
PROFESOR GUÍA: ANDRÉS EDUARDO QUIROZ CORTEZ

TEMUCO-CHILE

2013

“ESTUDIO DEL DESEMPEÑO DE ÁFIDOS (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EN CULTIVARES (QUIÑEQUELI INIA, REDQUELI INIA, SUPERQUELI INIA) Y LÍNEAS EXPERIMENTALES DE TRÉBOL ROSADO (*Trifolium pratense* L.)”

PROFESOR GUÍA:

ANDRÉS EDUARDO QUIROZ CORTEZ
DR. EN QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
QUÍMICAS Y RECURSOS NATURALES
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

PROFESOR CONSEJERO:

FERNANDO ORTEGA KLOSE
INGENIERO AGRONOMO Ph. D.
CENTRO REGIONAL DE
INVESTIGACION INIA CARILLANCA

CALIFICACION PROMEDIO TESIS:

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis	2
1.2 Objetivos.....	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Descripción del trébol rosado	3
2.2 El trébol rosado en Chile	4
2.2.1 Cultivar Quiñequeli INIA.....	4
2.2.2 Cultivar Redqueli INIA	5
2.2.3 Cultivar Superqueli INIA	5
2.3 Fitomejoramiento del trébol rosado en La Araucanía	6
2.4 Plagas y enfermedades del trébol rosado	7
2.5 Antecedentes generales de los áfidos.....	8
2.5.1 Daños que causan los áfidos a su hospedero.....	8
2.5.2 Descripción morfológica general de los áfidos	9
2.5.3 Ciclo biológico de los áfidos.....	10
2.5.4 Áfidos plagas en especies forrajeras	10
2.6 Descripción de los áfidos presentes en trébol rosado en La Araucanía.....	11
2.6.1 <i>Therioaphis trifolii</i> (Monell)	11
2.6.1.1 Daño	11
2.6.1.2 Descripción morfológica	11
2.6.1.3 Ciclo de vida y hábitos	12

2.6.1.4 Hospederos	13
2.6.2 <i>Brachycaudus helichrysi</i> (Kaltenbach)	13
2.6.2.1 Daño	13
2.6.2.2 Descripción morfológica	13
2.6.2.3 Hospederos	14
2.7 Métodos de control de áfidos.....	14
2.7.1 Control químico.....	14
2.7.2 Control cultural	15
2.7.3 Control biológico.....	15
2.7.4 Control integrado.....	16
2.8 Control de áfidos en forrajeras.....	16
2.9 Desempeño de áfidos	17
2.10 Resistencia de las plantas frente a los insectos	18
2.10.1 Comportamiento del insecto frente a la resistencia y susceptibilidad de la planta	19
2.10.1.1 Antibiosis.....	19
2.10.1.2 Antixenosis	19
2.11 Fluctuación poblacional de áfidos en leguminosas.....	20
2.12 Planteamiento del problema.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Muestreos de áfidos en terreno	22
3.1.1 Identificación y conteo de áfidos en laboratorio provenientes de terreno.....	23
3.1.2 Protocolo preparación permanente para conservación y posterior identificación de especies.....	23
3.1.3 Determinación de especies de áfidos presentes en trébol rosado.....	24

3.1.4 Análisis estadístico.....	25
3.2 Ensayos de desempeño de <i>Nearctaphis bakeri</i> en trébol rosado en condiciones de laboratorio.....	25
3.2.1 Crianza de áfidos.....	25
3.2.1.1 Siembra cultivar Quiñequeli INIA.....	26
3.2.1.2 Transplante.....	26
3.2.1.3 Riego.....	27
3.2.1.4 Fertilización.....	27
3.2.1.5 Condiciones ambientales de la cámara de cultivo.....	27
3.2.1.6 Infestación de áfidos.....	27
3.2.1.7 Aislaciones.....	29
3.2.2 Evaluación de antibiosis de <i>N. bakeri</i> , sobre tres cultivares y una línea experimental de trébol rosado.....	30
3.2.2.1 Siembra.....	30
3.2.2.2 Diseño experimental.....	30
3.2.2.3 Infestación.....	31
3.2.2.4 Cuantificación de la población final de <i>N. bakeri</i>	31
3.2.2.5 Análisis estadístico.....	32
3.2.3 Evaluación de la antixenosis.....	32
3.2.3.1 Crianza de <i>N. bakeri</i> para ensayos olfatométricos.....	32
3.2.3.2 Plantas para ensayos de preferencia de volátiles.....	32
3.2.3.3 Experimentos olfatométricos.....	33
3.2.3.4 Análisis estadístico.....	34
4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	35

4.1 Poblaciones de áfidos provenientes de ensayos de terreno.....	35
4.1.1 Fluctuación poblacional de áfidos.....	35
4.1.2 Cuantificación de especies de áfidos presentes en trébol rosado y su abundancia relativa en cada cultivar y línea experimental.....	37
4.2 Evaluación del desempeño de <i>Nearctaphis bakeri</i>	41
4.2.1 Evaluación de la tasa reproductiva (antibiosis).....	41
4.2.2 Ensayos olfatométricos (Antixenosis).....	42
4.2.3 Relación entre antibiosis y antixenosis	43
5. CONCLUSIONES.....	44
6. RESUMEN.....	45
7. SUMMARY	46
8. LITERATURA CITADA.....	47
9. AGRADECIMIENTOS.....	53
10. ANEXOS.....	54

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Trébol rosado (<i>T. pratense</i>) en estado de plena floración (22 de febrero de 2013).	4
Figura 2. A) Presencia de oídio en plantas de trébol, enero 2011, B) presencia de áfidos en tallos de trébol rosado, febrero, 2012.	7
Figura 3. Sintomatología de virosis en plantas de trébol rosado. A) Clorosis (enero, 2012), B) Deformación (Febrero, 2013).	9
Figura 4. Esquema general de un áfido áptero (izquierda) y un individuo alado (derecha) (Original-B.P.A.).	10
Figura 5. <i>Therioaphis trifolii</i> (Monell) (Pulgón manchado de la alfalfa) (Tomado de Aguilera <i>et al.</i> , 1996).	12
Figura 6. <i>Brachycaudus helichrysi</i> (Kaltenbach). A) Último segmento antenal, B) Vertex, C) Alas, D) Caudas y sifón, y E) Cauda vista lateral (Adaptado de Aguilera y Ortega, 1994). 14	14
Figura 7. A) Ensayo de trébol rosado INIA Carillanca, B) Muestreo en parcelas experimentales.	22
Figura 8. Materiales de trabajo en Laboratorio para conteo de áfidos bajo lupa, A) Mesón y materiales de trabajo, B) vista de áfidos en tallo de trébol rosado, C) vista de áfidos en hojas de trébol rosado.	23
Figura 9. A) Microscopio estereoscópico, B) Microscopio estereoscópico con muestra etiquetada, C) Vista objetivo áfidos montado en preparación permanente.	24
Figura 10. Plantines (spleedlings) de trébol rosado, A) 2 días después de siembra, B) 4 días después de emergencia, C) 7 días después de emergencia, D) tres plantines con diferente fecha de siembra, E) plantines listo para trasplante a maceta.	26
Figura 11. Plantas de trébol rosado en macetas, previo a la infestación con áfidos.	27
Figura 12. Infestación de áfidos a plantas de macetas. A) Mesa de trabajo para infestación, B) Infestación de un áfido.	28
Figura 13. Áfidos criados en laboratorio, A) ninfa F1 en Quiñequeli INIA, B) F1 antes de infestar nuevas plantas, C) F2 alado y no alados y D) áfidos F3 en Quiñequeli INIA antes de infectar los cultivares.	29

Figura 14. Macetas de plantas Quiñequeli INIA en cámara de cultivo. A) Macetas con aislación individual, B) macetas con aislación grupal.....	30
Figura 15. Ensayo desempeño de áfidos en trébol rosado.....	31
Figura 16. Plantas para crianza de áfidos en laboratorio.....	32
Figura 17. Ensayo olfatométrico. A) Sistema olfatométrico completo B) Olfatómetro de cuatro brazos, C) áfido en olfatómetro.	34
Figura 18. Fluctuación poblacional de áfidos en trébol rosado y temperatura (mínima, máxima y media promedio) en la Región de La Araucanía durante el periodo de muestreo. ↓Fecha de aplicación de química para control de áfidos.	35
Figura 19. Fluctuación poblacional de áfidos en trébol rosado y pluviometría en la Región de La Araucanía durante el periodo de muestreo. ↓ Fecha de aplicación de química para control de áfidos.	36
Figura 20. Promedio poblacional por especie de áfidos presentes en trébol rosado. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \leq 0,05$) N=264.....	37
Figura 21. Promedio acumulado (febrero-2012 a enero-2013) de las distintas especies de áfidos por cultivar y líneas experimentales de trébol rosado. Letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba estadística de Friedman, seguida de Conover-Inman ($P \leq 0,05$). N=44.....	38
Figura 22. Promedio acumulado (febrero-2012 a Enero-2013) de <i>N. bakeri</i> por cultivar y líneas experimentales de trébol rosado. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba estadística no paramétrica de Friedman, seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \leq 0,05$). N=44.	39
Figura 23. Fluctuación poblacional mensual de áfidos por especies presentes en trébol rosado en La Araucanía. ↓Fechas de corte de forraje, ↓Fecha de aplicación de química para control de áfidos.	40
Figura 24. Respuesta reproductiva de <i>N. bakeri</i> en distintos cultivares y línea experimental de trébol rosado. Ausencia de letras indica diferencias no significativas según la prueba no	

paramétrica de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$) $N = 9$. Las barras sobre las columnas indican error estándar.42

Figura 25. Respuestas olfatométrica *N. bakeri* adultos hacia volátiles de la parte aérea de dos cultivares de trébol rosado. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \leq 0,05$). Zona de decisión (ZD). $N = 15$43

1. INTRODUCCIÓN

Los áfidos (Hemiptera: Aphididae) son insectos de gran impacto económico debido al daño directo e indirecto que causan a su hospedero, lo que se traduce en una disminución del rendimiento agronómico. El daño directo se genera por la incorporación de saliva tóxica y la extracción de savia, lo cual trae como consecuencia clorosis y muerte de hojas. El daño indirecto se relaciona con la transmisión de virus. En Chile y el mundo, las plantas hospederas de áfidos de mayor relevancia agrícola son especies pertenecientes a las familias Poaceae, Solanaceae y Leguminosae. Dentro de esta última destaca el trébol rosado (*Trifolium pratense* L.), la cual es una especie forrajera muy cultivada en Chile tanto por su forraje como por la exportación de su semilla.

Desde hace décadas el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA Carillanca, ha desarrollado una línea de investigación enfocada al Fitomejoramiento de esta forrajera de acuerdo a parámetros agronómicos tales como, rendimiento de materia seca (MS), calidad de semilla, sobrevivencia y cobertura de plantas, a partir de lo cual se han creado líneas experimentales de trébol rosado entre las que se encuentran Syn II Pre III, Syn Int IV, Syn Int V y Syn Int VI (Superqueli INIA) que han presentado mejores rendimientos en el tiempo comparado con el cultivar Quiñequeli INIA y al más reciente Redqueli INIA. Debido a esta razón, algunas de estas líneas experimentales se encuentran prontas a salir al mercado. Tomando en cuenta: 1) el fitomejoramiento del trébol rosado, 2) el impacto de los áfidos sobre la agricultura y en especial sobre esta forrajera, y 3) recientes observaciones de fuertes ataques en La Araucanía (Ortega, 2011-12¹) tanto en primavera como en periodo estival, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Existen diferencias en el desempeño de los áfidos entre los cultivares y líneas experimentales de trébol rosado en la Región de La Araucanía?.

Para la Región de La Araucanía se han reportado en trébol rosado las especies de áfidos *Therioaphis trifolii* (Monell) y *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach) (Aguilera, 1990; Aguilera

¹ Dr. Fernando Ortega, 2011-2012. Fitomejorador de Forrajeras, INIA Carillanca, Temuco, Chile. Comunicación personal.

y Ortega, 1994). Sin embargo, no existen reportes sobre densidad poblacional de áfidos en trébol rosado, nivel de daño económico, especies presentes actualmente, fluctuación poblacional por temporada y desempeño en los distintos cultivares presentes en La Araucanía.

El desempeño es la respuesta del insecto al alimentarse de su hospedero, la cual varía dependiendo de su susceptibilidad o resistencia. Esto se evalúa mediante la antibiosis y antixenosis. La antibiosis es la resistencia de la planta que afecta la biología del insecto (reproducción, mortalidad, peso), mientras que la antixenosis afecta el comportamiento del insecto (no preferencia).

1.1 Hipótesis

El desempeño de áfidos varía en los distintos cultivares y líneas experimentales trébol rosado.

1.2 Objetivo general

Evaluar el desempeño de áfidos en tres cultivares y tres líneas experimentales de trébol rosado.

1.3 Objetivos específicos

- I. Establecer la fluctuación poblacional de áfidos en trébol rosado.
- II. Determinar y cuantificar la especie de áfido que se encuentra en mayor proporción sobre cultivares y líneas experimentales de trébol rosado.
- III. Evaluar la respuesta de antibiosis del áfido encontrado en mayor proporción, bajo condiciones de laboratorio, en tres cultivares y una línea experimental (Syn Int V) de trébol rosado.
- IV. Determinar la respuesta de antixenosis del áfido encontrado en mayor proporción, hacia volátiles de la parte aérea del cultivar Quiñequeli INIA versus Superqueli INIA.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descripción del trébol rosado

El trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) pertenece a la familia Leguminosae y es considerada una de las especies forrajeras más importantes en las zonas templadas del mundo. Se caracteriza por su capacidad de producir gran cantidad de forraje de alta calidad (alto contenido de proteína y buen contenido mineral) principalmente en el periodo estival (Demagnet, 2008). Es una especie perenne de vida corta, con una duración de 2-3 años. Es una planta que permite disminuir los costos en fertilizantes, por su capacidad fijadora de nitrógeno, la que además tiene un efecto residual para el próximo cultivo. Los rendimientos del cultivo son altos, especialmente en el segundo año de establecida, habiéndose logrado experimentalmente 15 ton MS/ha (Torres & Dumont, 1991).

Presenta un hábito de crecimiento erecto, con numerosos tallos, que nacen de una corona gruesa, alcanzando hasta 60 cm de altura. Sus hojas son trifoliadas y pubescentes. La inflorescencia es un capítulo globular con flores de color rosado a púrpura (Fig. 1). La raíz es pivotante profunda, con muchas ramificaciones laterales, que le confiere resistencia a los periodos de déficit hídrico. Las raíces laterales se concentran en los primeros 15 cm de profundidad, y en ellas se encuentran los nódulos con los rizobios, los cuales permiten la fijación biológica de nitrógeno (Demagnet, 2008).



Figura 1. Trébol rosado (*T. pratense*) en estado de plena floración (22 de febrero de 2013).

2.2 El trébol rosado en Chile

En Chile, el trébol rosado es la especie forrajera en la cual se ha desarrollado mejoramiento genético con mayor énfasis, desarrollando cultivares nacionales cuya semilla no solo es producida para el consumo nacional sino también para exportación, principalmente a países de América Latina. Además de Quiñequeli INIA y Redqueli INIA que ya son cultivares públicos en Chile, recientemente se registró el cultivar protegido Superqueli INIA (Ortega y Levio, 2011a,b). Esta especie forrajera en la zona sur es ampliamente utilizada principalmente en sistema de rotación para pastoreo invernal y conservación de forraje (Demagnet, 2008).

2.2.1 Cultivar Quiñequeli INIA. El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), realizó un trabajo de fitomejoramiento de trébol rosado, el cual permitió en 1962, liberar al mercado este cultivar (Avendaño, 1965). Creado por un grupo de investigadores liderado por el Doctor Raúl Avendaño, fue el primer cultivar de trébol rosado del país. Este cultivar es diploide de floración intermedia de alta heterogeneidad de plantas y baja tolerancia a la enfermedad “oídio del trébol”. Una desventaja que presenta este cultivar es su baja persistencia (3 años) producto de la susceptibilidad a enfermedades del tallo, hojas y coronas, junto con los frecuentes ataques de

Hylastinus obscurus, lo cual se traduce en una baja población de plantas en la segunda a tercera temporada (Demanet, 2008).

2.2.2 Cultivar Redqueli INIA. Este cultivar sintético fue creado en INIA Carillanca (Temuco, Chile) utilizando un método de fitomejoramiento avanzado que da lugar a cultivares denominados genéticamente como sintéticos. El cultivar se creó policruzando siete plantas madres: tres plantas provenientes de Quiñequeli INIA, dos de cultivares introducidos desde Estados Unidos (Prosper I y Tristan) y dos colectas realizadas en diferente localidades de la Región de La Araucanía. El objetivo principal de la creación de este cultivar sintético fue incrementar el rendimiento, persistencia y población de plantas en el tercer año de producción comparado a Quiñequeli INIA (Ortega *et al.*, 2003). Además presenta una resistencia mayor a enfermedades foliares como oídio del trébol (*Erysiphe trifolii* Grev.) y radicales comparado con Quiñequeli INIA (Ortega *et al.*, 2003).

Este cultivar sintético diploide se diferencia morfológicamente de Quiñequeli INIA por presentar plantas de corona más ancha, mayor número de tallos, menor porcentaje de plantas con marcas en las hojas y menor proporción de plantas con flores rosado claro.

2.2.3 Cultivar Superqueli INIA. Este cultivar sintético fue creado a partir de la continuidad del programa de fitomejoramiento de forrajeras de INIA, como resultado de distintas evaluaciones en diversas localidades en la Región de La Araucanía. Este cultivar fue generado en el cuarto ciclo del programa a partir de la selección de plantas con el objetivo de mejorar parámetros agronómicos como el rendimiento de forraje y persistencia en relación con el cultivar Quiñequeli INIA y Redqueli INIA. Para obtener Superqueli INIA se cruzaron siete plantas madres (genotipos) provenientes de cuatro familias. En cuanto a las características morfológicas, se diferencia de los cultivares antes mencionado por una mayor frecuencia en la marca foliar pero a su vez una menor intensidad, color de la semilla más claro y cotiledones de mayor tamaño, inicio de floración intermedia, largo de tallos y entre nudos mediano (Ortega y Levío, 2011a).

Este cultivar se caracteriza agronómicamente por presentar evidente superioridad, principalmente en cuanto a sobrevivencia de plantas, rendimiento de forraje y persistencia productiva (Ortega y Levío, 2011b).

2.3 Fitomejoramiento del trébol rosado en La Araucanía

Según Ortega (2009), el crecimiento sustentable de la producción bovina y ovina en el contexto del modelo agroexportador chileno debe basarse en gran medida en el mejoramiento de su base forrajera.

Con el objetivo de mejorar y optimizar la producción de trébol rosado en La Araucanía, este programa ha desarrollado desde hace algunas décadas una línea de investigación orientada al fitomejoramiento de esta planta para superar la producción de los cultivares ya existentes: el antiguo cultivar Quiñequeli INIA (Avendaño, 1965), el cultivar Redqueli INIA (Ortega *et al.*, 2003) y el más reciente cultivar Superqueli INIA (Ortega y Levío, 2011a,b).

Los parámetros agronómicos utilizados para el fitomejoramiento de esta forrajera son rendimiento de materia seca (MS), sobrevivencia y cobertura de plantas, y rendimiento de semilla. En cuanto a los resultados de esta investigación se han obtenido diversas líneas experimentales de trébol rosado, entre las cuales están: Syn II Pre III, Syn Int IV, Syn Int V y Syn Int VI (actual Superqueli INIA). Estas líneas han presentado mejores resultados de acuerdo a los parámetros agronómicos evaluados en el tiempo comparado al antiguo cultivar Quiñequeli INIA y a Redqueli INIA. El programa ha cumplido importantes objetivos, en primera instancia por la reciente creación y protección de una de estas líneas experimentales Superqueli INIA y en segunda instancia, la existencia de otras líneas experimentales que se encuentran en etapas finales de evaluación.

2.4 Plagas y enfermedades del trébol rosado

La principal plaga que afecta a esta leguminosa en el mundo, es el insecto barrenador de la raíz *Hylastinus obscurus* (Steiner & Alderman, 2003), al cual se le atribuye la baja persistencia de este cultivo. Entre las enfermedades que se describen de mayor importancia se encuentran hongos que atacan la corona (Graham & Newton, 1959; Carrillo & Mundaca, 1974). Sin embargo, existen otras plagas y enfermedades que afectan este cultivo en determinados periodos del año que de una u otra forma disminuyen el rendimiento (Fig. 2).



Figura 2. A) Presencia de oídio en plantas de trébol, enero 2011, B) presencia de áfidos en tallos de trébol rosado, febrero, 2012.

Los áfidos (Fig. 2B) son uno de los grupos de insectos que afectan a diversos cultivos como es el caso del trébol rosado disminuyendo su rendimiento debido al daño directo e indirecto que causan en la pastura (Dughetti, 2012), la disminución del rendimiento en trébol rosado se atribuye principalmente a la transmisión de virus (Smith y Maxwell, 1971; Khadhar *et al.*, 1984; Bowen y Plumb, 1979). Además, debido al aumento en las temperaturas, que es uno de los factores abióticos más determinantes en desarrollo poblacional de los áfidos, sumado a

recientes observaciones en terreno (Ortega, 2011-12¹), se vislumbra que el aumento de las poblaciones de áfidos podría causar fuertes daños en la pradera debido a fuertes ataques de estos insectos en primavera y periodo estival.

2.5 Antecedentes generales de los áfidos

Los áfidos son un grupo numeroso de especies que se caracterizan por presentar una estructura llamada corniculos o sifones, por la cual emiten una sustancia cerosa que actúa como feromona de alarma. Cuando un individuo es molestado por un depredador, emite esta feromona y el resto de la colonia, por medio de los receptores dispuestos en las antenas, quedan en estado de alerta. Además se caracterizan por la expulsión de miel o sustancia azucarada por medio del ano, la cual impregna a su hospedero y capta partículas que lo ensucian. También existen hongos del género *Capnodium* y otro conocido como “fumagina”, que se desarrollan en ese sustrato (Artigas, 1994).

2.5.1 Daños que causan los áfidos a su hospedero. Al succionar la savia de sus hospederos, incorporan saliva tóxica, produciendo variadas alteraciones tales como, manchas localizadas, clorosis (Fig.3.A), marchitez, e incluso deformaciones de la planta (Fig.3.B). Por otra parte, numerosas especies están directamente relacionadas con la transmisión de virus fitopatógenos (Aguilera *et al.*, 1996).

¹ Dr. Fernando Ortega, 2011-2012. Fitomejorador de Forrajeras, INIA Carillanca, Temuco, Chile. Comunicación personal.



Figura 3. Sintomatología de virosis en plantas de trébol rosado. A) Clorosis (enero, 2012), B) Deformación (Febrero, 2013).

2.5.2 Descripción morfológica general de los áfidos. Se les reconoce por su cuerpo globoso y frágil, con un par de corniculos o sifones en el dorso posterior del abdomen. Los adultos de esta familia son de tamaño pequeño, de 1,1 a 5,0 mm de largo, en algunos casos el cuerpo está cubierto de pruinosidad blanca o secreciones algodonosas. Los corniculos están desarrollados en todos los áfidos, aunque en algunos su desarrollo es moderado. La cabeza es pequeña bien implantada en el protórax, más ancha en su base; las antenas son variables pero en general setiformes, de entre 3 y 6 segmentos. El último segmento a menudo con áreas o bandas transversas, alargadas o circulares de órganos sensoriales (Fig. 4) (Artigas, 1994).

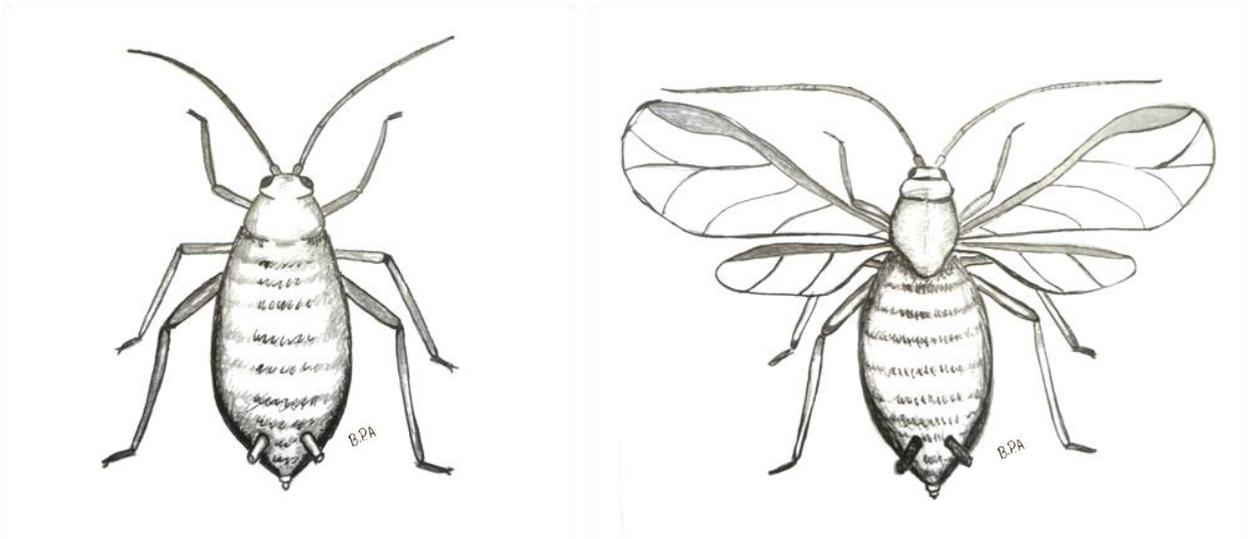


Figura 4. Esquema general de un áfido áptero (izquierda) y un individuo alado (derecha) (Original-B.P.A.).

2.5.3 Ciclo biológico de los áfidos. Su ciclo biológico es complejo en el cual se involucran diferentes fenómenos reproductivos tales como, partenogénesis, oviparidad, viviparidad y generaciones donde los machos pueden ser muy escasos o simplemente no existir (desconocidos) (Artigas, 1994). Los áfidos presentan un amplio potencial biótico; se reproducen rápidamente formando numerosas colonias en plantas que les sirven de albergue y alimento. Su forma particular de reproducirse, con generaciones partenogenéticas, sexuadas, ápteras y aladas favorece notablemente su dispersión, sobre todo cuando son ayudados por vientos suaves y cálidos (Aguilera *et al.*, 1996).

2.5.4 Áfidos plagas en especies forrajeras. Para Chile se mencionan varias especies de áfidos en plantas forrajeras. Entre estas se encuentran *Metopolophium dirhidum* (Walker), *Acyrtosiphon kondoi* (Shinji), *A. pisum* (Harris), *Rhopalosiphum maidis* (Fich), *R. padi* (L.), *Shizaphis graminum* (Rond) y *Sitobion avenae* (Fab.), *Aphis craccivora* (Koch), *A. fabae* (Scop), *A. gossypii* Glover, *Brevicoryne brassicae* (L.), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) y *Therioaphis trifolii* (Monell). Algunas de estas especies viven de preferencia en gramíneas, otras en leguminosas, y algunas habitan indistintamente en ambos grupos de plantas (Aguilera *et al.*, 1996).

Según Blackman & Eastop (2000) en el trébol (*Trifolium* ssp.) se describen las siguientes trece especies más comunes de áfidos; *Acyrtosiphon pisum*; *Aphis craccivora*, *A. coronillae*, *Aulacorthum solani*; *Brachycaudus helichrysi*; *Myzus ornatus*; *Nearctaphis bakeri*, *N. crataegifoliae*; *Sitobion akebiae*; *Subacyrthosiphon cryptobium*; *Therioaphis brachytricha*, *T. luteola*, *T. trifolii*.

Las especies de áfidos reportadas hasta la fecha para la Región de La Araucanía en trébol rodado son: *Therioaphis trifolii* (Monell) y *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach) (Aguilera, 1990; Aguilera y Ortega, 1994).

2.6 Descripción de los áfidos presentes en trébol rosado en La Araucanía

2.6.1 *Therioaphis trifolii* (Monell). Este áfido es originario de Europa. Se reportó en Chile por primera vez en 1988, comuna de Vilcún, Provincia de Cautín, Región de La Araucanía (Aguilera, 1990).

2.6.1.1 Daño. Es realizado de forma directa sobre los folíolos por la acción mecánica de su aparato bucal picador chupador. Con esta acción introduce al torrente savial de la planta una toxina, produciendo manchas en las hojas (Aguilera *et al.*, 1996).

2.6.1.2 Descripción morfológica. Es un áfido de cuerpo pequeño de 1,5 mm de largo, de color amarillo pálido, café muy claro o café amarillento. Ojos rojizos, antenas casi del mismo largo del cuerpo. Patas del mismo color del cuerpo; el tercio inferior de las tibias más oscuro, al igual que el tarso. Alas con venación poco abundante pero muy marcada. En las formas aladas el tórax es más desarrollado. El abdomen tiene en el dorso seis hileras de manchas oscuras. Las dos hileras centrales, hasta la mitad anterior del abdomen son más grandes y llevan dos cerdas tipo roma a diferencia de las otras más pequeñas que llevan solo una cerda. Esta especie se caracteriza por

presentar cerdas en forma individual o en pares, las cuales se montan sobre un diminuto o pequeño tubérculo respectivamente. Los sifones en esta especie son muy poco notorios. El abdomen, termina en una cauda la cual evidencia dos cerdas largas en su extremo apical. A ambos lados de la cauda se encuentran las placas anales con tres cerdas cada una. Los estadios ninfales por lo general son más claros que sus progenitores y a medida que avanza su desarrollo se van oscureciendo y marcando las manchas del abdomen (Fig. 5) (Aguilera, 1990).

2.6.1.3 Ciclo de vida y hábitos. Es una especie principalmente partenogenética, vivípara, existiendo hembras ápteras y aladas. Los ejemplares prefieren ubicarse en el envés de la hoja, cercanos a la nervadura central, aunque a veces se encuentran individuos en el haz de las hojas. El desarrollo es variable y depende de la temperatura: a 27°C constante, el ciclo se cumple en cinco días. Con variaciones de 8 a 34°C, el ciclo vital demora el doble. Los ciclos en periodo estival son más cortos, en cambio en invierno se alargan hasta 45 días bajo condiciones naturales, de tal manera que la especie puede presentar unas 15 generaciones al año (Aguilera, 1990).

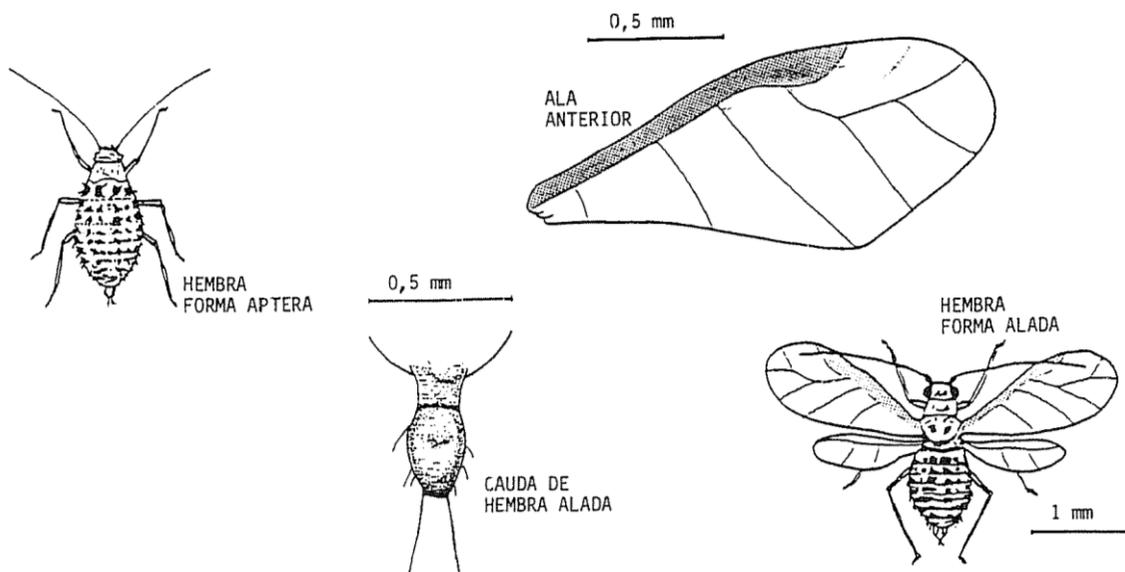


Figura 5. *Therioaphis trifolii* (Monell) (Pulgón manchado de la alfalfa) (Tomado de Aguilera *et al.*, 1996).

2.6.1.4 Hospederos. En la Región de La Araucanía las poblaciones más altas se han detectado en trébol blanco entre febrero y marzo; algo en trébol rosado y rara vez en alfalfa (Aguilera *et al.*, 1996).

2.6.2 *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach). Reportado por Aguilera y Ortega (1994), en trébol rosado, trébol blanco y alfalfa en la Región de La Araucanía (Fig. 6). Fue observado en ensayos aislados de casetas cubiertas con plástico y paredes de tul blanco, para producción de semilla, entre 1992 y 1993. Estos autores también observaron esta especie, bajo condiciones de invernadero y campo, a fines del verano y comienzos del otoño en alfalfa en 1992.

2.6.2.1 Daño. Importante transmisor de virus no persistente del tipo mosaico.

2.6.2.2 Descripción morfológica. Los adultos no alados miden entre 0,9 a 2,0 mm, son de color verde amarillento o café amarillento dependiendo de la época del año. El abdomen de los individuos no alados es immaculado pero con pelos cortos, no capitados, dispuestos dorsalmente en dos hileras y antenas cortas proporcionalmente no sobrepasan la mitad del cuerpo. Los ejemplares alados miden entre 1,1 a 2,2 mm, presentan cabeza, antenas, tórax y cornículos más oscuros que los no alados. La superficie abdominal en las formas aladas es manchada. En los ejemplares alados las antenas sobrepasan la mitad del cuerpo. Esta especie se caracteriza por poseer una cauda, vista dorsalmente, de forma lenguada, tan larga como ancha; plato anal entero. Ambos con cerdas (Fig. 6.E) (Aguilera y Ortega, 1994).

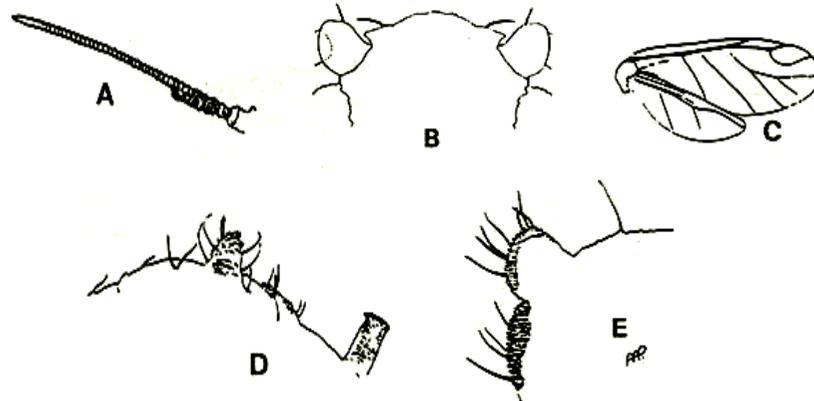


Figura 6. *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach). A) Último segmento antenal, B) Vertex, C) Alas, D) Caudas y sifón, y E) Cauda vista lateral (Adaptado de Aguilera y Ortega, 1994).

2.6.2.3 Hospederos. Este áfido se ha mencionado en Chile frecuentemente como huésped de especies frutales (*Prunus persica* L., *P. salicina* L., *P. domestica* L.), hortícolas (*Lycopersicon esculentum* M.) y florales (*Crysantemun morifolium* R.) (Klein y Waterhouse, 2000). Cuando se encuentra presente en *Trifolium* y quizás en otras leguminosas, según Aguilera y Ortega (1994), es usualmente visto como una forma distinta (= *warei* Theobald).

2.7 Métodos de control de áfidos

2.7.1 Control químico. El control químico de los áfidos es realizado a través del uso de insecticidas, los cuales deben poseer las siguientes características: 1) **Selectividad;** ingrediente activo con acción específica para los áfidos, excluyendo a los insectos polinizadores e insectos benéficos, 2) **Mecanismo de acción sistémica;** estos insecticidas son incorporados al torrente savial y así intoxican a los áfidos debido a sus características succionadoras del floema de la planta huésped. Esta propiedad permite mantener un control por un medio a largo periodo disminuyendo el número de aplicaciones y protegiendo así de transmisión de virosis; 3) **Largo**

efecto residual; se refiere a que el producto puede proteger más allá de 21 días del ataque de pulgones desde el momento de aplicación del insecticida y; **4) Baja toxicidad;** esto debido a que el insecticida afecta a la planta al incorporarse al torrente savial, por tanto, podría producir fitotoxicidad (Estay, 2003).

2.7.2 Control cultural. Estas prácticas son de carácter preventivo y no implican mayores gastos económicos, en algunos casos se beneficia además del control de áfidos indirectamente a otras plagas, que conllevan a mejores rendimientos del cultivo.

Control de malezas; debido a que estas las malezas son hospederas de pulgones es necesario un control antes y después del establecimiento del cultivo. Este control puede ser químico, mecánico o utilizando una alta densidad de plantación o siembra. De la última manera, se realiza indirectamente un control de las malezas ya que no tienen espacio suficiente para colonizar y se evita por lo tanto un desarrollo excesivo de malezas en el cultivo.

Uso de cultivares resistentes a áfidos; esto evita una proliferación excesiva de la población de áfidos o bien disminuye los efectos perjudiciales de estos insectos en el cultivo.

Uso de cultivares resistentes a virosis; debido a que los áfidos son los principales transmisores de virosis, una planta resistente a este patógeno evitaría mayores preocupaciones por la presencia de áfidos ya que los virus causan importantes pérdidas en el rendimiento de los cultivos y especialmente en trébol rosado. Por otra parte, debido a que muchos virus pueden ser transmitidos por las semillas, estas deben ser certificadas (la semilla es potencialmente una fuente principal de virus para el cultivo) (Undersander *et al.*, 1914).

2.7.3 Control biológico. El control biológico implica la utilización de un enemigo natural de estos insectos entre los cuales se distinguen dos grupos; los depredadores y los parasitoides. **Depredadores;** 1) chinitas (Coleoptera: Coccinellidae), tanto al estado de larva, como el adulto consume áfidos; 2) sírfidos (Diptera: Syrphidae), cuya larva se alimenta de áfidos y, 3) el

neuroptero *Chrysoperla* sp., (crisopa), que en su estado de larva. **Parasitoides;** microhimenópteros o microavispa de los géneros *Praon* y *Aphidius*. Estas especies colocan un huevo en el interior del cuerpo del pulgón, de allí eclosiona una larva la que se alimenta del áfido provocándole la muerte.

En general en Chile, el control biológico de los pulgones se da en forma natural, pero tienen la desventaja de que aparecen tarde en la temporada del cultivo, cuando las poblaciones de pulgones son muy altas y el daño ya está hecho. En invernadero es posible controlar los pulgones liberando enemigos naturales, en forma periódica. Esta liberación es conocida como control biológico inundativo o aumentativo (Estay, 2003).

También existen entomopatógenos que se presentan en condiciones naturales. Es el caso de especies de hongos del género *Entomophthora*, los que actúan al aire libre, en un período de humedad y temperaturas altas (Estay, 2003).

2.7.4 Control integrado. Este control se refiere a la utilización de más de uno de los controles anteriormente mencionados o bien la suma de estos para un control eficiente y sustentable de los áfidos.

2.8 Control de áfidos en forrajeras

En alfalfa los áfidos son controlados dependiendo del nivel de daño que se aprecie en el cultivo y el estado de desarrollo de este siendo más sensible el estado de plántula o bien utilizando cultivares resistentes al ataque de este grupo de insectos (Aguilera *et al.*, 1996).

En el caso de trébol rosado en la Región de La Araucanía, no existen reportes científicos de un control químico de las poblaciones de áfidos, sin embargo, en semilleros cuando los

niveles poblacionales a simple vista son muy altos y el daño es evidente se realiza un control aplicando Pirimor (Pirimicarb) (Ortega, 2013¹).

2.9 Desempeño de áfidos

Según Artigas (1994) existe una adaptación mutua planta-insecto, la cual involucra íntegramente el genomio (Medredov, 2009) de ambos, de manera que la adaptación es traspasada de generación en generación, produciéndose naturalmente algunas alteraciones como efecto de mutaciones y adaptaciones derivadas de la selección por largos periodos de tiempo. La tecnología actual permite realizar genética de alto nivel en plantas, en donde la ciencia ha logrado sus mayores éxitos. La aspiración de los genetistas vegetales es producir cultivares que conjuguen una alta productividad, gran calidad, precocidad y resistencia a los insectos y enfermedades. Sin embargo, los insectos que producen enormes cantidades de individuos al año, tienen la ventaja de ser sujetos de más “experimentos naturales (adaptaciones genéticas)” que los que logran efectuar los genetistas vegetales en el mismo tiempo (Artigas, 1994).

Según Silva *et al.* (2007) además de la temperatura que es el principal factor abiótico que afecta a los áfidos, también el nivel de infestación depende del cultivar ya que las respuestas pueden variar dependiendo del genotipo de su hospedero. Por lo tanto, conocer el desempeño de los insectos en los distintos genotipos de hospederos cumple un rol fundamental en el momento de elección de un cultivar, ya que saber cómo se comportan en cuanto a alimentación de cada genotipo permite discriminar o bien elegir aquel cultivar que presente características de resistencia y/o tolerancia a una plaga, en este caso que afecta el cultivo de trébol rosado.

Actualmente se ha observado que los áfidos se encuentran presentes en este cultivo en poblaciones que antes no se observaban en la Región de La Araucanía (Ortega, 2011-12¹). A

¹ Dr. Fernando Ortega, 2013. Fitomejorador de Forrajerías, INIA Carillanca, Temuco, Chile. Comunicación personal.

pesar de la potencialidad de daño que presentan los áfidos, no existen estudios enfocados a determinar el desempeño de estos en trébol rosado.

2.10 Resistencia de las plantas frente a los insectos

La correcta elección de los cultivares de trébol a utilizar es un aspecto importante para los sistemas de producción que basan la alimentación del ganado en esta leguminosa. Lo anterior formaría parte de un Manejo Integrado de Plagas (MIP) más completo. Esta elección debería estar sustentada en las características de los cultivares y/o líneas experimentales con la resistencia o susceptibilidad al ataque de plagas. De esta manera, se puede generar la mayor información sobre las posibles ventajas y desventajas de adaptación ecológica de cada cultivar, de manera de aconsejar su difusión sobre bases sólidas. Por lo tanto, el agricultor en base a la información disponible decidirá que cultivar elegir de acuerdo a las características agroclimáticas y adaptaciones más óptimas para las plagas y enfermedades que afectan el trébol rosado (Rossanigo, 1997).

Concepto de Plantas resistentes. Estas plantas se caracterizan por poseer características que les confieren un menor daño al ser atacadas por una plaga. Estas características son de carácter cualitativo y heredables, además para referirse a un cultivar resistente se debe hacer necesariamente una comparación con otro cultivar de la misma especie que sea susceptible (sin características de resistencia) cuando se comparan en cuanto a la proliferación poblacional de insectos plaga. La resistencia por lo tanto, es relativa y se basa en la comparación con plantas de distintos cultivares en una misma especie (Teetes, 1996).

¹ Dr. Fernando Ortega, 2011-2012. Fitomejorador de Forrajeras, INIA Carillanca, Temuco, Chile. Comunicación personal.

Concepto de Tolerancia de las plantas. Es la capacidad que posee la planta de soportar o recuperarse de los daños causados por la población de insecto plaga comparado con la variedad susceptible la cual no es capaz de recuperarse al ser afectada por la misma densidad de insectos plaga (Teetes, 1996).

2.10.1 Comportamiento del insecto frente a la resistencia y susceptibilidad de la planta. Los áfidos poseen un comportamiento determinado frente a su hospedero lo que depende de las adaptaciones de ambos. Esto se traduce en el desempeño del insecto al alimentarse de su planta hospedante, tal desempeño se mide a través de dos parámetros; el primero es la **antibiosis** el cual afecta la biología del insecto y consiste en una reducción de la capacidad reproductiva, longevidad o sobrevivencia (menor daño que en una planta susceptible) que presenta el insecto al alimentarse de su hospedero, y la segunda es la **antixenosis** la cual afecta el comportamiento del insecto y consiste en la no preferencia a través de sensores químicos del insecto (visual, olfativa, táctil y receptores gustativos) frente a una planta resistente (Teetes, 1996).

2.10.1.1 Antibiosis. Efecto adverso de la planta sobre la biología del insecto. Esta modalidad de defensa de la planta es utilizada para prevenir el daño o bien detener la vida del insecto. Según Dethier (1951), esta forma de resistencia se divide en dos fases: a) las plantas son deficientes como hospedadoras para el insecto y, b) las plantas presentan sustancias tóxicas para el insecto.

2.10.1.2 Antixenosis. Este término según Smith (2005) se define como una relación planta insecto en la cual la planta no sirve como anfitrión de un artrópodo, si no que una potencial plaga elige seleccionando a su planta hospedera suplente. El término de resistencia antixenosis fue descrito por Kogan y Ortman (1978) quienes con mayor precisión utilizan el término de no preferencia (Painter, 1951) de los insectos por una planta resistente, esto como un complemento a la resistencia por antibiosis de los insectos. La resistencia de antixenosis de la planta frente al insecto, implica la percepción del insecto de su medio ambiente, por lo tanto, involucra factores básicos de la percepción e integración de los estímulos externos detectados por el insecto, tales como estímulos olfativos, visuales, táctiles y receptores gustativos. Los estímulos olfativos de la

planta son percibidos a través de las sencilas de los insectos, localizadas en las antenas; por otra parte, las plantas producen volátiles fisiológicamente en todas sus estructuras (raíz, tallo, hojas, frutas, flores). Específicamente, en el follaje es donde se localizan la mayor cantidad de volátiles involucrados en la detección de la planta hospedera por parte del insecto (Guerin *et al.*, 1983). Estudios más recientes revelan que los insectos emplean el olfato para discriminar y determinar la diferencia entre una planta resistente y una susceptible, aceptando como hospedero a las plantas susceptibles por sobre resistentes (Lapis y Borden, 1993).

2.11 Fluctuación poblacional de áfidos en leguminosas

El nivel poblacional está determinado por la interacción entre el potencial reproductivo y su resistencia ambiental. El equilibrio o “balance biótico” que se logra, es fluctuante, pues tanto el potencial reproductivo como la resistencia ambiental fluctúan en las diferentes estaciones del año y en diferentes años. También varían según áreas geográficas. En las zonas templadas los factores abióticos son más importantes y en ocasiones determinantes del equilibrio biótico (Artigas, 1994). Las plagas y enfermedades en las plantas cultivadas son muchas y dependen de una multiplicidad de factores tanto bióticos como abióticos. El estudio de cada uno de los factores, dependiendo de su importancia, determinan tanto la persistencia (cuando se habla de cultivos con baja persistencia) o bien la rentabilidad en el tiempo cuando los factores bióticos y abióticos influyen en el cultivo.

Los niveles poblacionales de áfidos en trébol rosado no han sido estudiados, debido a que estos insectos no son los principales causantes de la baja persistencia de la pastura, incluso solo podrían ser una plaga ocasional. Sin embargo, no deben ser dejados de lado debido a que estos insectos sí podrían influir significativamente en temporadas calurosas con altas poblaciones, disminuyendo el rendimiento de materia seca (calidad), ya que existe una relación entre el periodo en que esta forrajera produce la mayor cantidad de materia seca de calidad y la mayor infestación reportada de este grupo de insectos. Por otra parte, también existe un daño indirecto

por la transmisión de una gran variedad de virus entomopatógenos a las plantas, luego de la infestación masiva de áfidos, además de los costos asociados a su control.

Según Edwardson y Christie (1986) se han detectado treinta y cuatro diferentes virus en trébol rosado, de los cuales solo siete son de mayor importancia: virus del mosaico amarillo del frijol (BYMV), virus del enanismo del maní (PSV), virus del mosaico del trébol rojo vena (RCVMV), virus del rayado del guisante (PStrV), virus del mosaico de la alfalfa (AMV), blanco del virus del mosaico del trébol (WCMV), y virus amarillo trébol (CYVV). En su mayoría transmitidos por los áfidos (Barnett y Diachun, 1985).

2.12 Planteamiento del problema

El trébol rosado es una forrajera muy importante en la zona sur de Chile, de acuerdo a lo cual en las últimas décadas se ha realizado mejoramientos genéticos, obteniéndose líneas experimentales que pronto saldrán al mercado, como es el caso de Superqueli INIA. Por otra parte, en terreno se ha observado que los áfidos se encuentran en poblaciones poco habituales (aumento poblacional), los cuales podrían estar causando daños tanto directos como indirectos en este cultivo; sin embargo no se tienen referencias que indiquen cual sería el daño económico. Además, no existe información sobre los niveles poblacionales de las especies presentes en las nuevas líneas experimentales, ni tampoco en los diferentes cultivares que existen comercialmente en La Región de La Araucanía. Por lo anterior, este trabajo plantea un estudio de desempeño de áfidos, con el fin de seleccionar los cultivares y/o líneas experimentales ya existentes entre resistentes y susceptibles. Por lo tanto, la pregunta de investigación es; ¿Existen diferencias en el desempeño de los áfidos entre los cultivares y líneas experimentales de trébol rosado en la Región de La Araucanía?

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestreos de áfidos en terreno

Los muestreos de áfidos en terreno para la determinación de especies y niveles poblacionales en trébol rosado se realizaron en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA Carillanca, Región de La Araucanía.

La metodología correspondió a una adaptación de lo propuesto por Gyenge *et al.* (1999) y Almeida *et al.* (2007). Para ello, se realizaron muestreos en terreno desde febrero de 2012 hasta enero de 2013, cada 30 a 45 días, en parcelas experimentales (1,4 m x 4m) de tres líneas experimentales (Syn Int V, Syn Int IV y Syn II Pre III) y tres cultivares (Quiñequeli INIA, Redqueli INIA y Superqueli INIA) de trébol rosado dispuestos en bloques completamente al azar con 4 repeticiones (Fig. 7 A). Se colectaron cinco brotes por parcela (120/muestreo), los que se depositaron en bolsas herméticas rotuladas (Fig.7 B) y almacenadas en un recipiente plástico para su posterior traslado al Laboratorio de Química Ecológica de la Universidad de La Frontera.

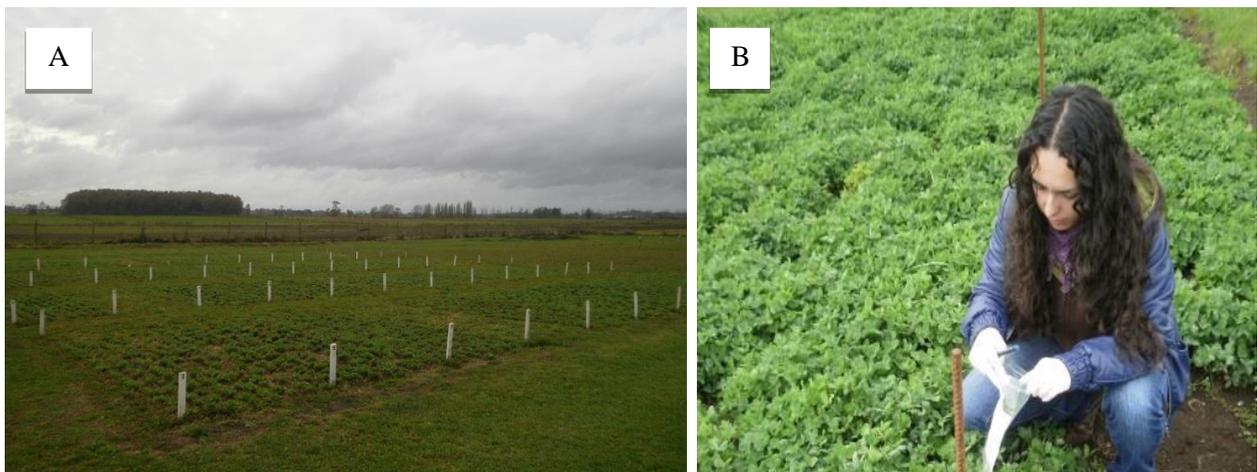


Figura 7. A) Ensayo de trébol rosado INIA Carillanca, B) Muestreo en parcelas experimentales.

3.1.1 Identificación y conteo de áfidos en laboratorio provenientes de terreno. Con ayuda de una lupa estereoscópica (WF10X) se contabilizaron y determinaron las especies de áfidos presentes en las muestras (Figs. 8A, B y C).

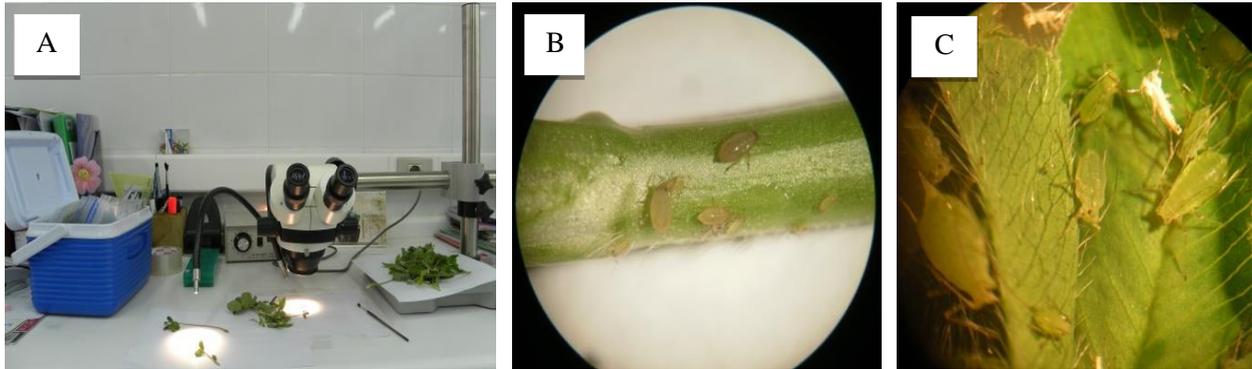


Figura 8. Materiales de trabajo en Laboratorio para conteo de áfidos bajo lupa, A) Mesón y materiales de trabajo, B) vista de áfidos en tallo de trébol rosado, C) vista de áfidos en hojas de trébol rosado.

Los áfidos colectados se guardaron en alcohol al 95% por un tiempo superior a tres semanas, para su posterior conservación definitiva en preparación permanente.

3.1.2 Protocolo preparación permanente para conservación y posterior identificación de especies.

La preparación permanente consistió en realizar una pequeña punción con un alfiler, en la región ventral del abdomen del áfido. Posteriormente, se colocó en un tubo de ensayo el cual contenía hidróxido de potasio al 10% con el objetivo de aclarar el cuerpo del áfido; luego, se colocó el tubo de ensayo sobre un mechero para ser calentando poco a poco evitando una reacción fuerte o que aclare demasiado. Se revisó al microscopio estereoscópico (Fig.9.A) hasta haber obtenido sólo el exoesqueleto del insecto. Posteriormente se deshidrató con alcoholes graduales al 30°, 50°, 60°, 70° y alcohol absoluto, con un tiempo de permanencia del organismo en cada alcohol de un minuto, escurriendo el exceso de alcohol entre cada cambio. Se transparentó con xilol para eliminar la opacidad provocado por el alcohol, y se montaron con

resina sintética en un porta objetos el cual se cubrió con el cubre objetos, para finalmente rotular (Figs. 9B, C) (Márquez, 2005).

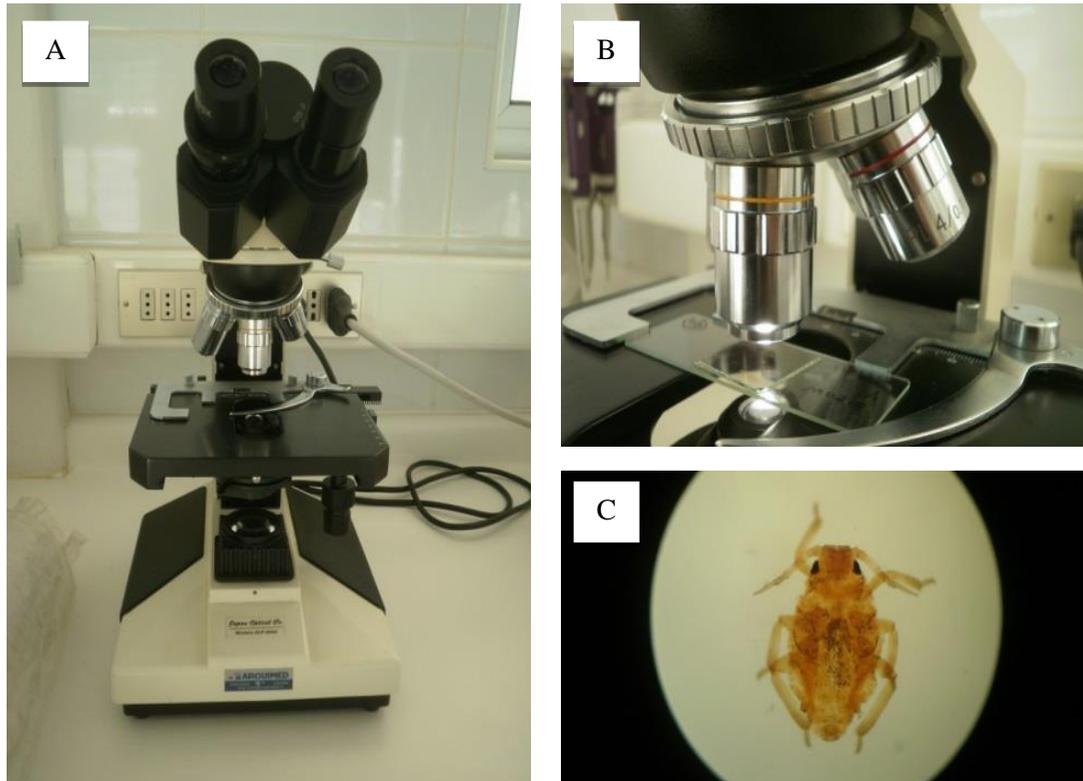


Figura 9. A) Microscopio estereoscópico, B) Microscopio estereoscópico con muestra etiquetada, C) Vista objetivo áfidos montado en preparación permanente.

3.1.3 Determinación de especies de áfidos presentes en trébol rosado. Para la determinación de las especies colectadas se realizaron distintas metodologías dependiendo de la disponibilidad de literatura adecuada. *Acyrtosiphon pisum* fue determinada de acuerdo a las claves descritas por Artigas (1994), al igual que la especie *Acyrtosiphon kondoi*. La especie *Therioaphis trifolii* se determinó de acuerdo a las claves descritas por Aguilera (1990). (Determinación confirmada por el Dr. Ramón Rebolledo, Universidad de La Frontera). *Nearctaphis bakeri* (Cowen) fue determinada de acuerdo a claves descritas por Blackman y Eastop (2000), para especies de áfidos presentes en trébol rosado (determinación confirmada por el Dr. Eduardo Fuentes, Universidad de Talca).

3.1.4 Análisis estadístico. Una vez realizados los muestreos mensuales desde febrero 2012 hasta enero 2013, y determinadas las distintas especies de áfidos identificadas, se realizaron dos tipos de análisis de datos no paramétricos. El primero no consideró el sistema de bloques, no haciendo distinción entre cultivares y líneas experimentales, y se compararon las especies de áfidos colectadas en trébol rosado. Estos datos se analizaron a través del test de Kruskal Wallis ($P \leq 0,05$). El segundo análisis estadístico consideró el diseño de bloques y se compararon las especies de áfidos presentes en cultivares y líneas experimentales, para lo cual se utilizó el test de Friedman ($P \leq 0,05$).

3.2 Ensayos de desempeño de *Nearctaphis bakeri* en trébol rosado en condiciones de laboratorio.

Previamente se realizó una crianza de *N. bakeri* (especie encontrada en mayor proporción), para posteriormente obtener generaciones cronológicamente uniformes en edad en la cantidad de individuos requerida en el ensayo de desempeño. Para ello, se aplicó una metodología de crianza adaptada de las propuestas por Flynn *et al.* (2004), Verdugo *et al.* (2012) y Ramírez (2013¹).

3.2.1 Crianza de áfidos. Se utilizó aproximadamente 640 individuos de tercera generación (F3) criados bajo condiciones de laboratorio, con la finalidad de obtener una población final uniforme en edad (días).

¹Dr. Claudio Ramírez, 2012. Doctor en Ecología. Laboratorio Interacciones Insecto-Planta. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca. Comunicación personal.

3.2.1.1 Siembra cultivar Quiñequeli INIA. El sustrato utilizado fue vermiculita, la cual fue lavada antes de su utilización. Este cultivar fue sembrado en almacigueras semirrígidas (spleedlings) con 105 cavidades. Las siembras del cultivar Quiñequeli INIA se realizaron cada dos semanas aproximadamente, para obtener plantas nuevas para cada generación de áfidos a replicar (Fig. 10).

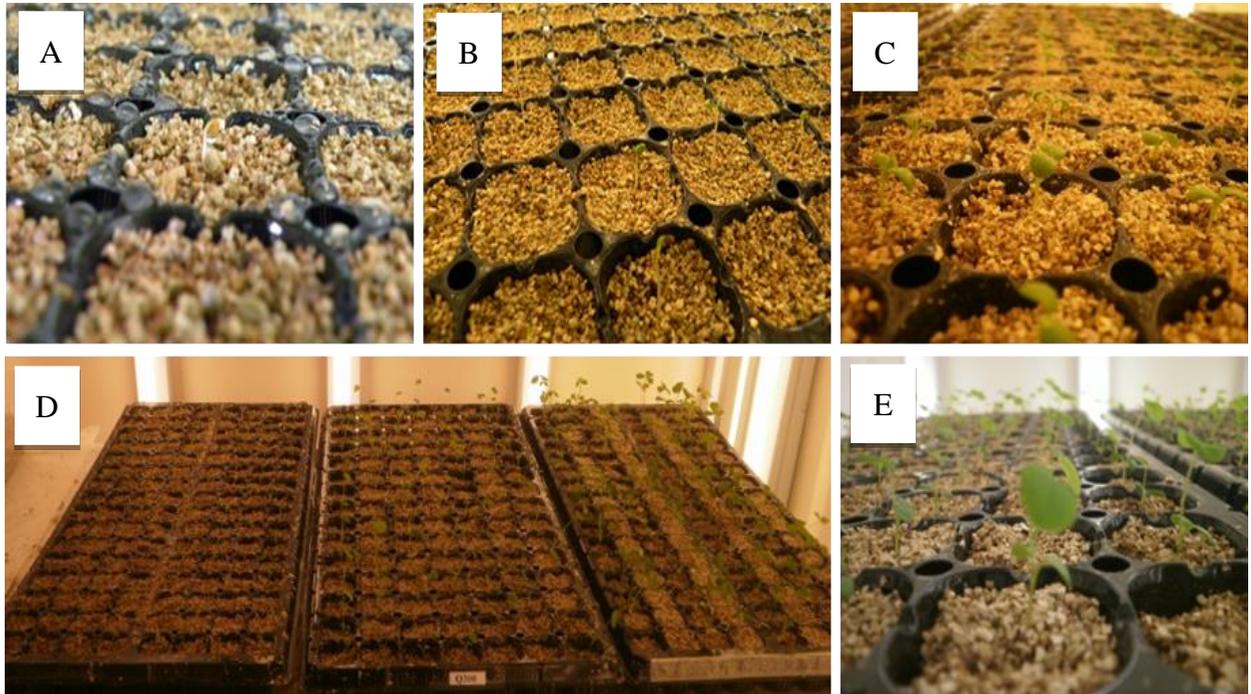


Figura 10. Plantines (spleedlings) de trébol rosado, A) 2 días después de siembra, B) 4 días después de emergencia, C) 7 días después de emergencia, D) tres plantines con diferente fecha de siembra, E) plantines listo para trasplante a maceta.

3.2.1.2 Transplante. Las plántulas emergidas con una edad de 15 días, fueron transplantadas a macetas de 0,3 litros de capacidad, y se mantuvieron por aproximadamente 10 días para su recuperación, previo a la infestación con áfidos (Fig. 11).



Figura 11. Plantas de trébol rosado en macetas, previo a la infestación con áfidos.

3.2.1.3 Riego. Las macetas fueron regadas diariamente de forma manual con aproximadamente 20 mm en almácigueras y 200 mm en macetas.

3.2.1.4 Fertilización. Las plantas fueron fertilizadas desde el día 15 cada 15 días, sustituyendo el riego con solución de Long Ashton adaptada según protocolo descrito por Douglas (1976). Ver detalles en anexos 1 y 2.

3.2.1.5 Condiciones ambientales de la cámara de cultivo. Las condiciones de crecimiento fueron; fotoperiodo de 16 horas luz/8 oscuridad, temperatura de 25 °C y 50 % humedad relativa. Se realizaron movimientos entre macetas diariamente de tal forma que cada maceta recibiera la misma cantidad de luz, al hacer la sumatoria de días. Además, se tomaron registros de temperatura y humedad relativa con un equipo Data Logger con el propósito de verificar que no existieran variaciones significativas de dichos parámetros ambientales. Los datos registrados por el instrumento se pueden observar en el anexo 3.

3.2.1.6 Infestación de áfidos. Se utilizaron plantas de 25 a 35 días de edad lo que significa según Bowley *et al.* (1984) el comienzo del crecimiento secundario, del hypocotilo y la raíz, respectivamente. Los **áfidos madre** colectados desde plantas de trébol rosado (cultivar

Quiñequeli INIA) fueron inoculados en 10 macetas (0,3 Litros c/u), conteniendo 4 plantas de trébol rosado del cultivar Quiñequeli INIA (Fig. 12) de 20-25 días de edad.

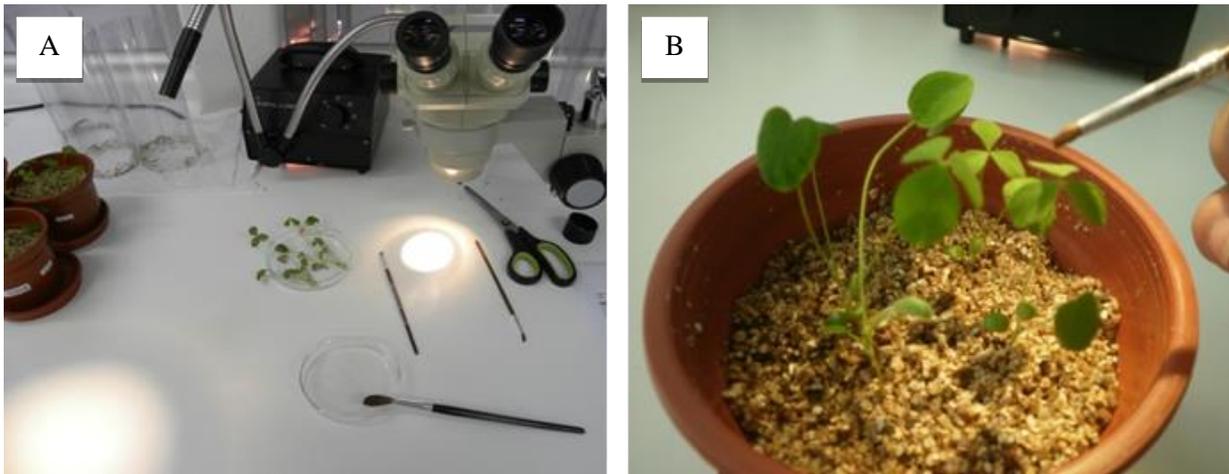


Figura 12. Infestación de áfidos a plantas de macetas. A) Mesa de trabajo para infestación, B) Infestación de un áfido.

Una vez obtenida una población mínima de 40 áfidos proveniente de la primera generación en laboratorio (F1), se procedió a infestar plantas nuevas de trébol rosado del cultivar Quiñequeli INIA de 20-25 días de edad, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Este procedimiento se repitió hasta obtener una población de 640 áfidos de tercera generación (F3) (Fig. 13) (Anexo 4).

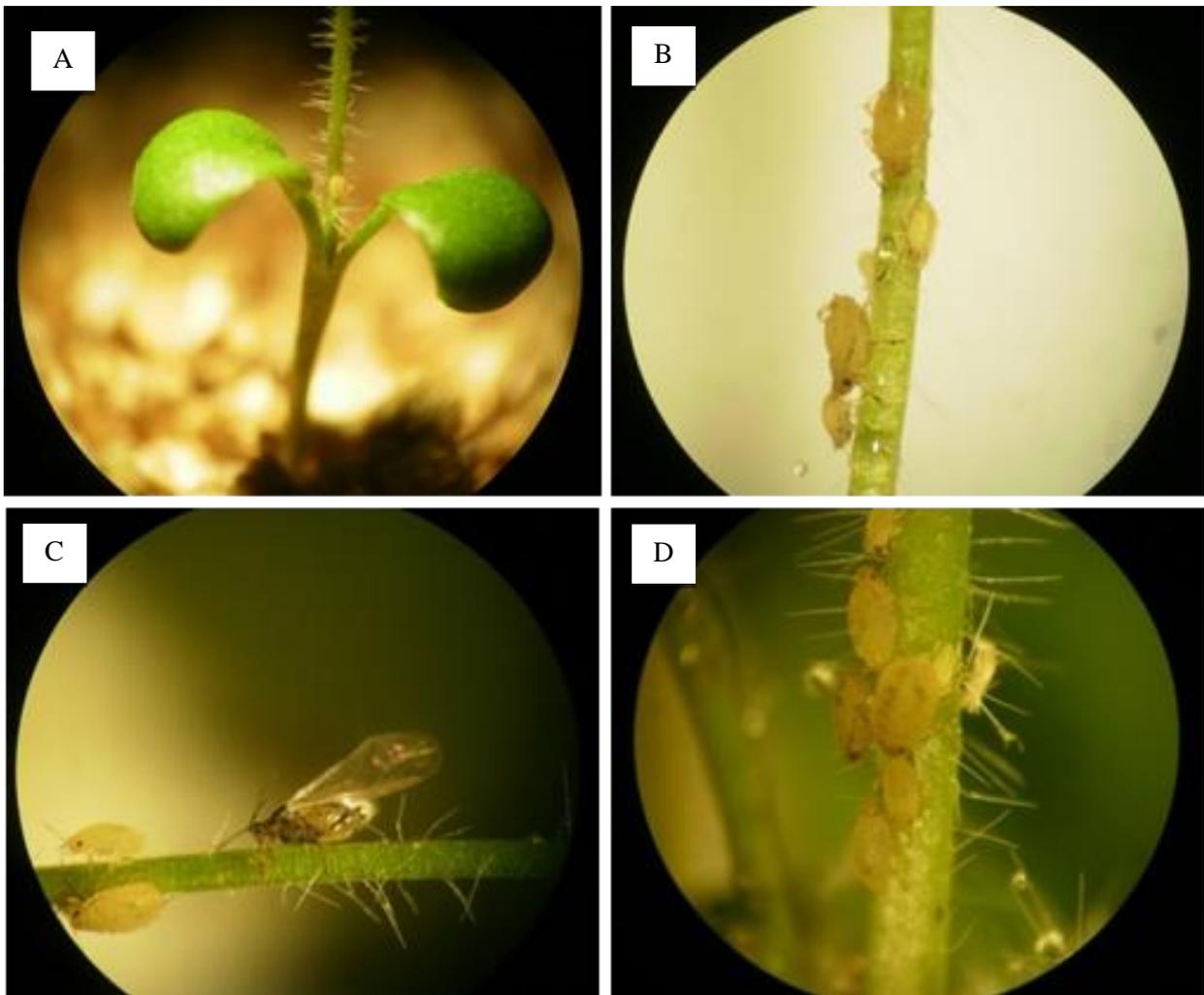


Figura 13. Áfidos criados en laboratorio, A) ninfa F1 en Quiñequeli INIA, B) F1 antes de infestar nuevas plantas, C) F2 alado y no alados y D) áfidos F3 en Quiñequeli INIA antes de infectar los cultivares.

3.2.1.7 Aislaciones. Inmediatamente luego de la infestación individual de cada maceta, estas se aislaron con un cono cilíndrico plástico cuya parte superior fue cubierta con una tela semi-transparente para permitir la aireación de las plantas y de los áfidos. Además se aislaron grupalmente las macetas infestadas con el objetivo de evitar una contaminación de áfidos desde fuera o hacia dentro del experimento en la cámara de cultivo (Fig. 14).



Figura 14. Macetas de plantas Quiñequeli INIA en cámara de cultivo. A) Macetas con aislamiento individual, B) macetas con aislamiento grupal.

3.2.2 Evaluación de antibiosis de *N. bakeri*, sobre tres cultivares y una línea experimental de trébol rosado

3.2.2.1 Siembra. Se sembraron tres cultivares y una línea experimental de trébol rosado, con el mismo procedimiento utilizado para plantas del cultivar Quiñequeli INIA, para posterior trasplante a macetas siguiendo la metodología detallada en 2.2.1.2. Se utilizó una bandeja de speedling por cultivar. En el caso de la línea experimental se utilizaron dos bandejas debido a su bajo porcentaje de germinación en comparación con los cultivares.

3.2.2.2 Diseño experimental. Este consistió en un diseño completamente al azar, con nueve maceteros por tratamiento (Quiñequeli INIA, Superqueli INIA, Syn Int V, Redqueli INIA) y cuatro plantas en cada maceta. La infestación consistió en colocar 10 áfidos en cada maceta de tal forma de infestar simultáneamente los cuatro tratamientos. Una vez dentro de la cámara de cultivo, cada maceta fue dispuesta al azar (Fig. 15). La línea experimental Syn Int V fue seleccionada para realizar este ensayo (además de los cultivares), ya que en terreno fue la que presentó las más altas poblaciones de áfidos por brote en comparación a cultivares y líneas experimentales (Fig. 21 y 22).



Figura 15. Ensayo desempeño de áfidos en trébol rosado.

3.2.2.3 Infestación. Se infestaron las macetas con una población inicial de 10 áfidos, estas se criaron bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad, fotoperiodo, fertilización y riego antes mencionadas.

3.2.2.4 Cuantificación de la población final de *N. bakeri*. Las poblaciones finales se cuantificaron con la metodología descrita para conteo poblacional de especies provenientes de terreno, con la diferencia de que en este caso se procedió a cortar desde la base del tallo cada planta y posteriormente se contaron los individuos.

Según la metodología descrita por Verdugo *et al.* (2012) para evaluar el desempeño de los áfidos se utilizó la fórmula (PGR) descrita por Gotelli (2001), la cual indica la tasa reproductiva que tuvo la población de áfidos evaluada en un tiempo determinado. Esta fórmula es igual a $(\ln N^{\circ} \text{ final} - \ln N^{\circ} \text{ inicial}) / N^{\circ} \text{ días}$ donde $N^{\circ} \text{ final}$, se refiere a la cantidad de áfidos al final del experimento, $N^{\circ} \text{ inicial}$, se refiere a la cantidad inicial de áfidos y $N^{\circ} \text{ días}$, corresponde número de días que duro el experimento.

3.2.2.5 Análisis estadístico. El análisis estadístico para comparar la tasa reproductiva de los áfidos *N. bakeri* fue realizado a través de un test no paramétrico de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

3.2.3 Evaluación de la antixenosis. Para la evaluación de antixenosis se realizaron ensayos de no preferencia de volátiles de la parte aérea de plantas de distinto cultivar de trébol rosado.

3.2.3.1 Crianza de *N. bakeri* para ensayos olfatométricos. Los áfidos (*N. bakeri*) fueron criados bajo condiciones de laboratorio (anexo 3) hasta la obtención de individuos F3 (tercera generación) en plantas del cultivar Quiñequeli INIA, siguiendo la metodología propuesta por Quiroz y Niemeyer (1997). Las plantas infestadas fueron cubiertas por un tela semitransparente para impedir contaminación de áfidos entre plantas o bien externa al experimento (Fig. 16).



Figura 16. Plantas para crianza de afidos en laboratorio.

3.2.3.2 Plantas para ensayos de preferencia de volátiles. Un grupo de plantas de trébol rosado, muestreado en el campo experimental con pala, correspondientes a los cultivares Quiñequeli INIA y Superqueli INIA fueron trasladados desde el campo experimental hasta el Laboratorio de

Química Ecológica y se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio por una semana para su aclimatación en macetas de 4 litros (suelo original) antes de su utilización.

3.2.3.3 Experimentos olfatométricos. Las plantas fueron introducidas en una campana de vidrio conectada a un olfatómetro (Fig. 17.A) (Quiroz *et al.*, 2005) para determinar el comportamiento individual de áfidos adultos ápteros hacia volátiles liberados desde la parte aérea de las plantas. El olfatómetro está dividido en 5 partes: 4 de las cuales contienen aire enriquecido con volátiles de la parte aérea de las plantas de trébol rosado, 2 de ellos fueron enriquecidos con volátiles de Quiñequeli INIA, mientras que los otros 2 brazos con volátiles de Superqueli INIA, y la zona central llamada zona de decisión (ZD), el olfatómetro está constituido por 3 placas de acrílico, la inferior se cubre con papel filtro, la central que forma una cavidad la cual constituye las 5 divisiones antes descritas y por último la placa superior la cual se conectó a una bomba que genera un flujo negativo de 200 ml/min de aire. Cada individuo fue escogido al azar para someterlo al experimento, tomando como criterio solo el estado de desarrollo (tamaños similares). En el experimento se utilizó una champa de plantas Quiñequeli INIA y una champa de plantas Superqueli INIA, de tal forma de evaluar la no preferencia del insecto frente a uno de los dos cultivares, el tiempo de evaluación olfatométrica por cada individuo fue de 20 minutos, esto se repitió hasta completar un número de 15 individuos. Para cada repetición se utilizó un olfatómetro limpio, esterilizado con etanol. Estos experimentos fueron realizados en agosto de 2012 (Pacheco *et al.*, 2012) (Fig. 17).

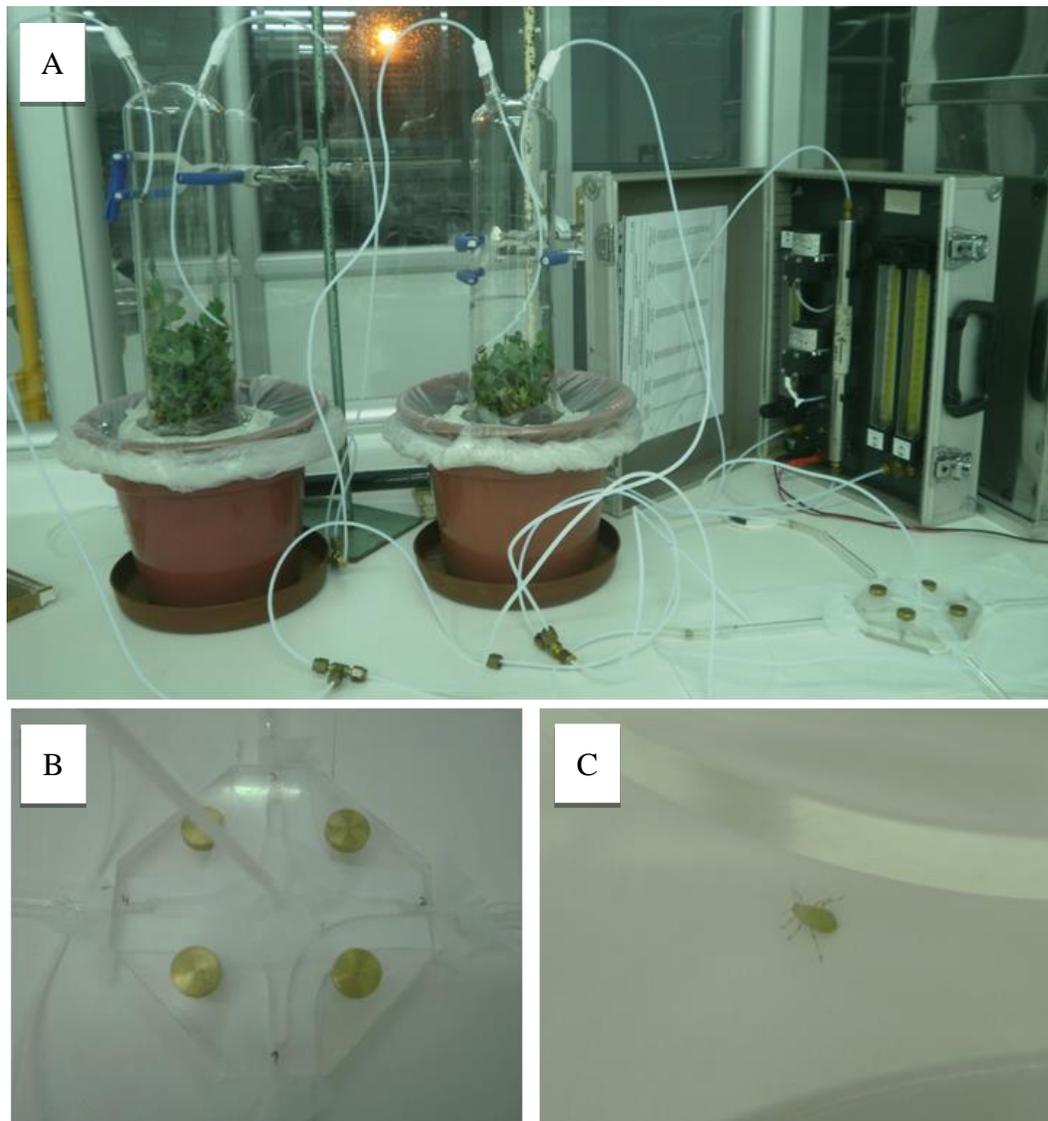


Figura 17. Ensayo olfatométrico. A) Sistema olfatométrico completo B) Olfatómetro de cuatro brazos, C) áfido en olfatómetro.

3.2.3.4 Análisis estadístico. El análisis estadístico de la respuesta olfatométrica de los áfidos *N. bakeri* fue realizado a través de un test no paramétrico de Kruskal-Wallis test ($P \leq 0,05$).

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Poblaciones de áfidos provenientes de ensayos de terreno

4.1.1 Fluctuación poblacional de áfidos. Tal como se puede observar en la figura 18 los aumentos poblacionales ocurren principalmente en primavera y finales del periodo estival, esto coincidente con aumentos de la temperatura en ambos periodos (Fig. 18) y disminución de la pluviometría (Fig. 19). En Febrero-2012 se obtuvo un promedio de 43,5 áfidos por muestra, en marzo un promedio de 21,8 áfidos por muestra y a finales de primavera (noviembre) un promedio aproximado de 18,9 áfidos por muestra. Las poblaciones más bajas se presentaron en los meses de mayo, junio (invierno) y enero (verano) con un promedio de 0,7 áfidos, este último se atribuye a la aplicación de insecticidas para el control de áfidos.

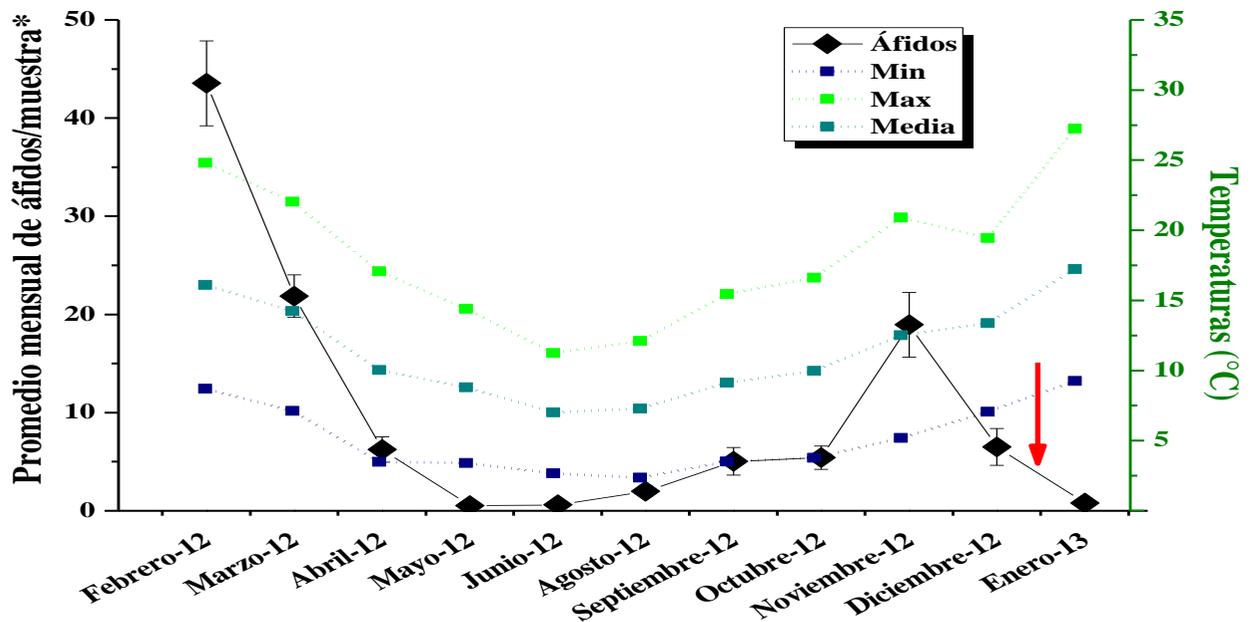


Figura 18. Fluctuación poblacional de áfidos en trébol rosado y temperatura (mínima, máxima y media promedio) en la Región de La Araucanía durante el periodo de muestreo. ↓ Fecha de aplicación de química para control de áfidos.

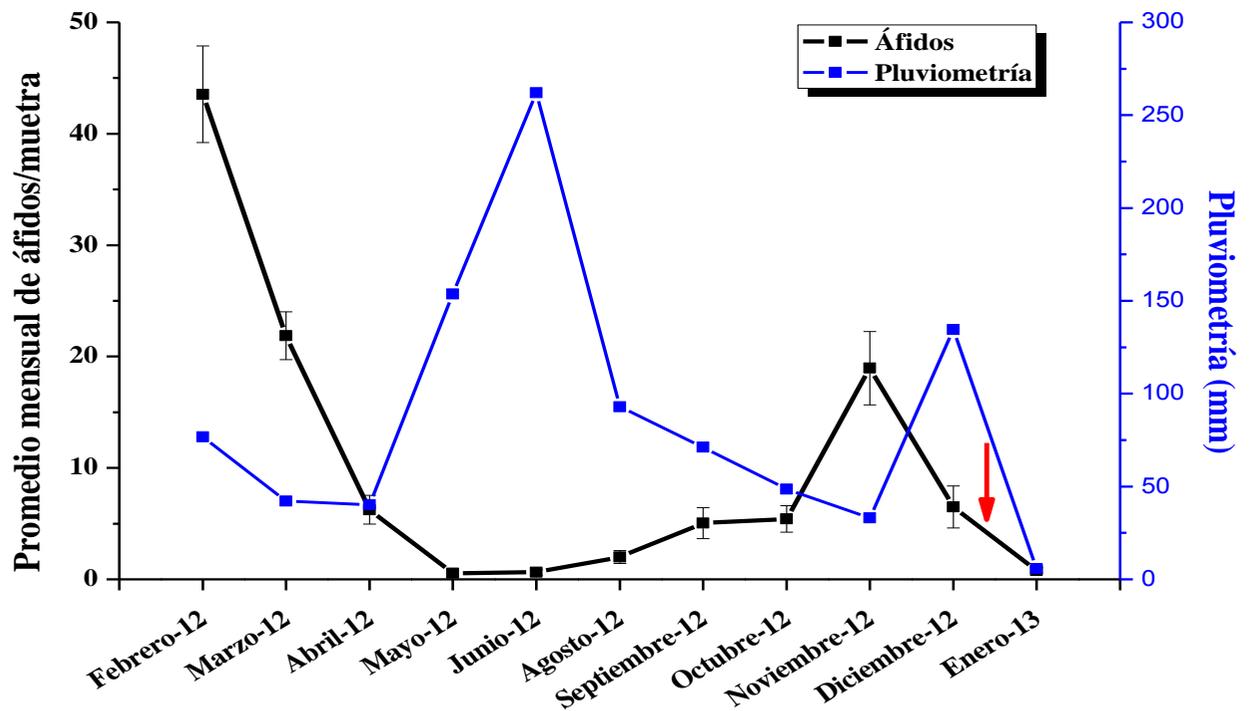


Figura 19. Fluctuación poblacional de áfidos en trébol rosado y pluviometría en la Región de La Araucanía durante el periodo de muestreo. ↓ Fecha de aplicación de química para control de áfidos.

Aunque algunos autores mencionan que ocurren variaciones en la fluctuación poblacional de los áfidos cada año (Artigas, 1994; Niño *et al.*, 2001; Mazzuferi *et al.*, 2011), estos resultados dan una primera aproximación de la variación anual que ocurre con estas poblaciones en la región y además podría convertirse en una herramienta para posteriores estudios sobre la presencia de estos áfidos en trébol rosado. Por otra parte, entrega datos de cuando iniciar (mes) un monitoreo de las poblaciones, para un posible control. Tal como se muestra en la figura 19, la población más abundante se presentó en periodo estival, lo que es coincidente con Niño *et al.* (2001) en donde las curvas poblacionales aumentan en periodos secos (verano) en cultivo de papa. Estos resultados de fluctuación poblacional (fig.18, 19) son coincidentes con lo descrito para el áfido *Myzocallis coryli* (Goeze) en La Región de La Araucanía (Aguilera *et al.*, 1994).

4.1.2 Cuantificación de especies de áfidos presentes en trébol rosado y su abundancia relativa en cada cultivar y línea experimental. Las especies presentes en trébol rosado correspondieron a *Acyrtosiphon pisum*, *A. kondoi*, *Therioaphis trifolii* y *Nearctaphis bakeri*, siendo esta última encontrada en mayor proporción (Fig. 20 y 23).

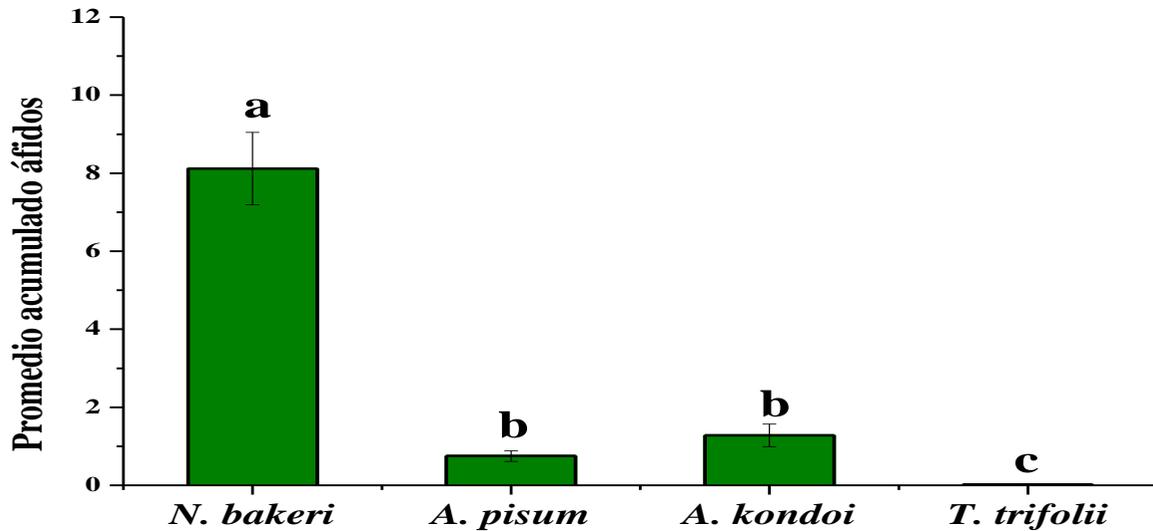


Figura 20. Promedio poblacional por especie de áfidos presentes en trébol rosado. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \leq 0,05$) $N=264$.

Estos resultados (Fig. 20) indican que el áfido *N. bakeri* fue el más abundante comparado con las otras especies de áfidos colectadas en trébol rosado. Además, es el primer reporte de esta especie en la Región de La Araucanía, lo cual difiere con lo informado por Aguilera (1990) y Aguilera y Ortega (1994) debido a que no reportan este insecto para la región. Según Stary *et al.* (1993), Stary *et al.* (1994) y Fuentes *et al.* (1997) este áfido ha sido colectado en la zona central de Chile en especies leguminosas (*Medicago sativa* y *Trifolium repens*). Debido a estos reportes, se puede inferir que este áfido probablemente llegó hace pocos años a la región y posiblemente el trébol rosado podría ser un hospedero adecuado para su establecimiento. Sin embargo,

diversos estudios, tales como prospecciones periódicas, son necesarios para confirmar esta inferencia.

Los áfidos presentes en trébol rosado (02/2012-01/2013) (Fig. 21) fueron significativamente más abundantes en el cultivar Redqueli INIA y la línea experimental Syn Int V, mientras que el cultivar Superqueli INIA presentó una abundancia de áfidos significativamente menor a Quiñequeli INIA, Redqueli INIA y Syn Int V. Por otra parte, se pudo determinar a través de promedios acumulados durante el año de muestreo, que *N. bakeri* presentó una abundancia poblacional significativamente superior sobre el cultivar Redqueli INIA en comparación a los cultivares y líneas experimentales (Fig. 22), mientras que sobre Superqueli INIA *N. bakeri* presentó una abundancia significativamente menor.

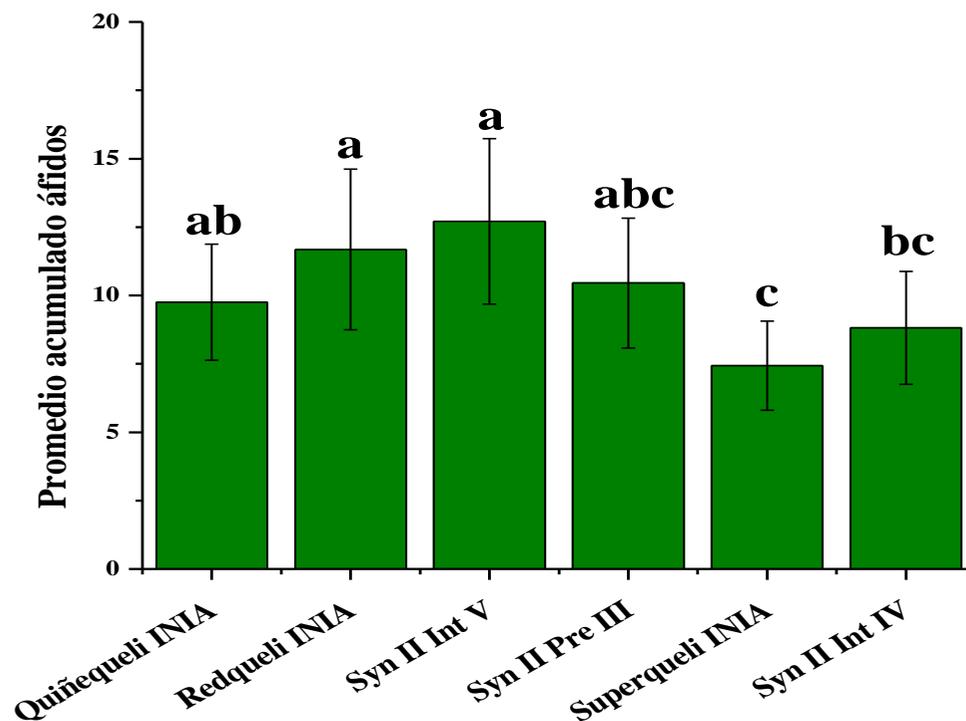


Figura 21. Promedio acumulado (febrero-2012 a enero-2013) de las distintas especies de áfidos por cultivar y líneas experimentales de trébol rosado. Letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba estadística de Friedman, seguida de Conover-Inman ($P \leq 0,05$). N=44.

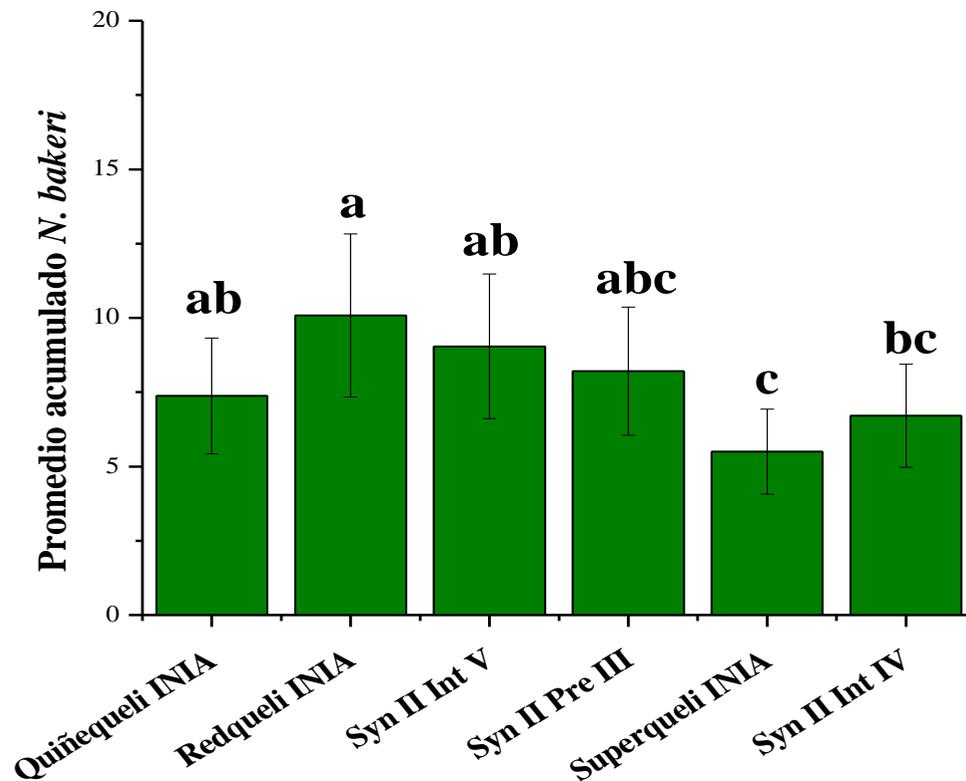


Figura 22. Promedio acumulado (febrero-2012 a Enero-2013) de *N. bakeri* por cultivar y líneas experimentales de trébol rosado. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba estadística no paramétrica de Friedman, seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \leq 0,05$). N=44.

La menor abundancia de áfidos sobre el cultivar Superqueli INIA durante el año de muestreo podría sugerir que los áfidos, principalmente *N. bakeri*, poseen un menor desempeño sobre este cultivar en comparación a los antiguos cultivares (Quiñequeli INIA y Redqueli INIA) y líneas experimentales de trébol rosado a nivel de campo (Figs. 21 y 22). Por lo tanto este nuevo cultivar (Superqueli INIA) podría ser más resistente a la infestación del insecto (*N. bakeri*). Esta característica de resistencia fue sugerida antes por Alarcón et al. (2010) quienes reportaron que este nuevo cultivar presentaba el mayor rendimiento agronómico y la menor tasa de infestación del insecto *Hylastinus obscurus* en comparación a los dos cultivares antiguos y varias líneas experimentales.

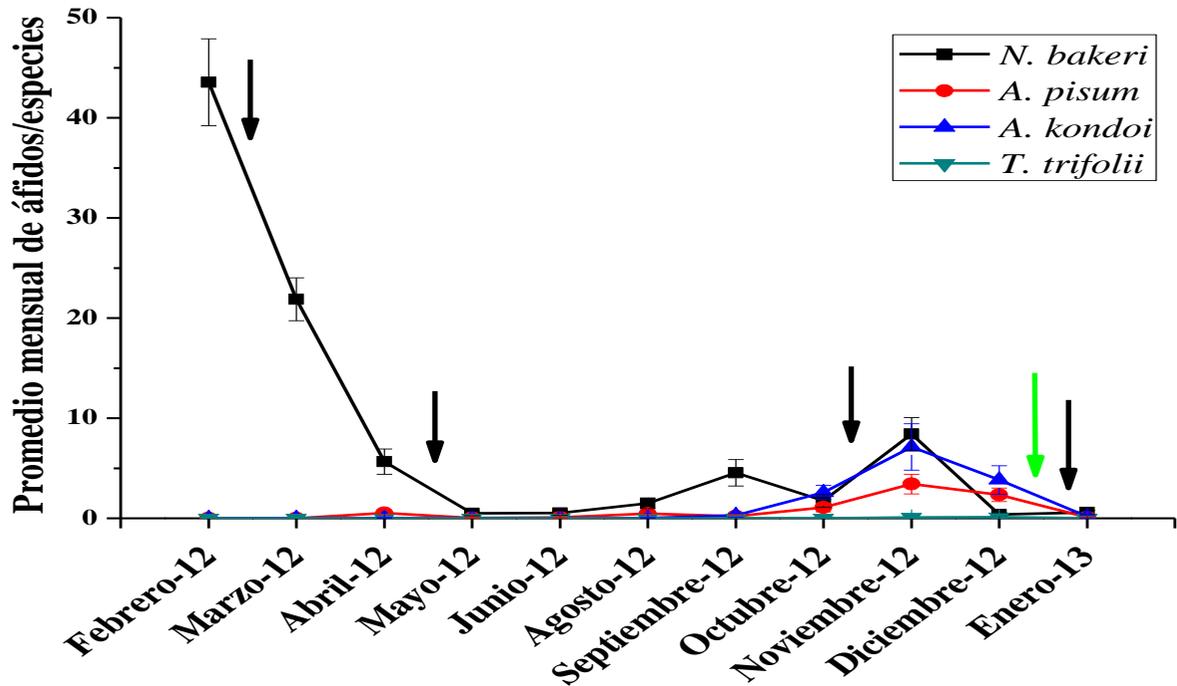


Figura 23. Fluctuación poblacional mensual de áfidos por especies presentes en trébol rosado en La Araucanía. ↓ Fechas de corte de forraje, ↓ Fecha de aplicación de química para control de áfidos.

Tal como se puede observar en la figura 23 el áfidos *N. bakeri* se encuentra durante todo el año, mientras que los otros áfidos tuvieron una infestación ocasional principalmente en primavera. Cabe mencionar que a simple vista una población de *A. pisum* y *A. kondoi* (tamaño entre 3,2-4,5 mm) fue más evidente que *N. bakeri* debido a que este último, según Dreves (1990), posee un menor tamaño y se aloja principalmente en las axilas. Esto requirió de una inspección detallada (abrir axilas) para su detección, lo que en muchos casos implicó un daño para la planta examinada, esto es muy importante en el momento de determinar aplicaciones de insecticidas ya que probablemente a simple vista la mayor población de áfidos no se pueda apreciar o bien se realice un control cuando las poblaciones no son tan abundantes, tal como ocurrió en este ensayo de trébol rosado (Fig. 23).

Por otra parte, algunos autores mencionan que cada especie de áfido posee diferentes requerimientos de temperatura para reproducirse (Artigas, 1994; Hodgson, 2007), por lo tanto la temperatura es un factor determinante del crecimiento y abundancia poblacional de cada especie de áfidos, es así como las condiciones de invierno (bajas temperaturas) disminuyen o retrasan el desarrollo de las poblaciones de áfidos.

4.2 Evaluación del desempeño de *Nearctaphis bakeri*

4.2.1 Evaluación de la tasa reproductiva (antibiosis). El análisis estadístico de la tasa reproductiva diaria de *N. bakeri* no mostró respuesta significativa entre cultivares y línea experimental de trébol rosado, por lo que se infiere que estas plantas no presentaron una modalidad de resistencia de antibiosis cuando esta especie de áfido se alimentó de las plantas de distintos cultivares y/o líneas experimentales (Fig. 24). Según Mancía (1972), la antibiosis parece ser en muchos casos el carácter más deseable en la selección varietal, pero en muchos cultivares de plantas otras modalidades de resistencia son tan importantes como esta. Debido a lo mencionado por Mancía (1972) estos resultados de antibiosis no serían determinantes en la selección de cultivares resistentes, debido a que este es sólo uno de los componente que interactúan en la resistencia de las plantas y ningún componente que interactúa en la resistencia de las plantas es absoluto.

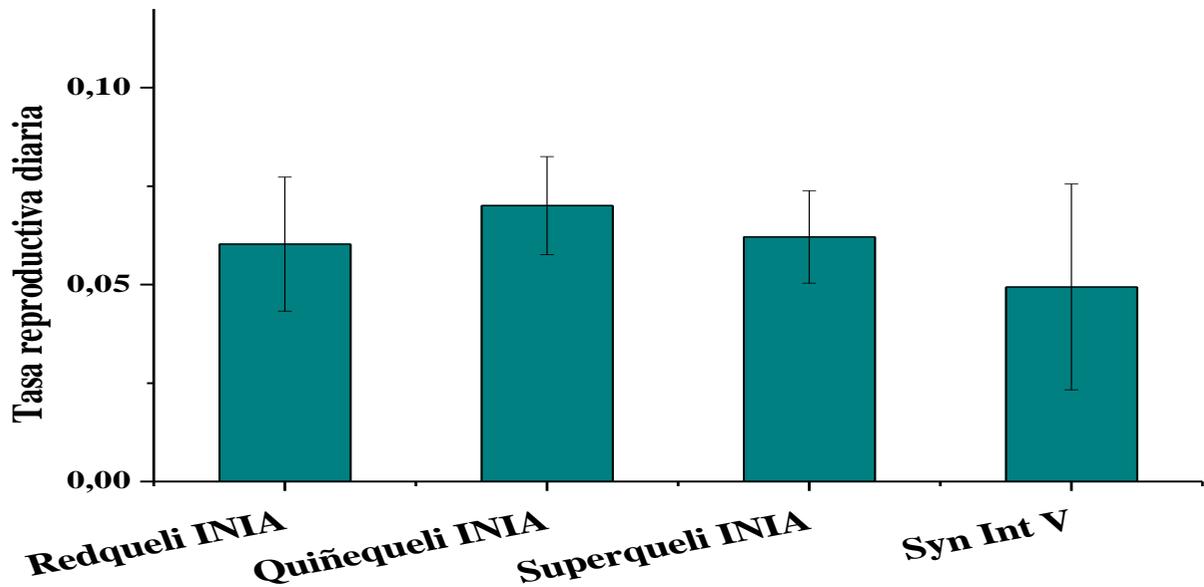


Figura 24. Respuesta reproductiva de *N. bakeri* en distintos cultivares y línea experimental de trébol rosado. Ausencia de letras indica diferencias no significativas según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$) $N = 9$. Las barras sobre las columnas indican error estándar.

4.2.2 Ensayos olfatométricos (Antixenosis). Como se puede observar en la figura 25 los áfidos fueron más atraídos hacia los volátiles liberados por el cultivar Quiñequeli INIA comparado con los volátiles de Superqueli INIA. Los resultados de aceptación o repelencia hacia distintos cultivares son consistentes con estudios relacionados con la aceptación de diferentes cultivares contra áfidos en otros cultivos como la avena (De Zutter *et al.*, 2012). Este ensayo entregó como principal resultado que el cultivar Superqueli INIA, presentó una forma de resistencia de antixenosis frente a *N. bakeri*, debido a que se observó una no preferencia significativa frente al cultivar Superqueli INIA en comparación al cultivar Quiñequeli INIA. Experimentos similares con otras especies de insectos demuestran que no existe sesgo* debido al instrumento (olfatómetro), sino que la respuesta del insecto se atribuye exclusivamente a los tratamientos evaluados (Hueichapán, 2011; Quiroz *et al.*, 1998; Palma *et al.*, 2012).

* Sesgar: Error sistemático (está condicionado por algún factor distinto al azar).

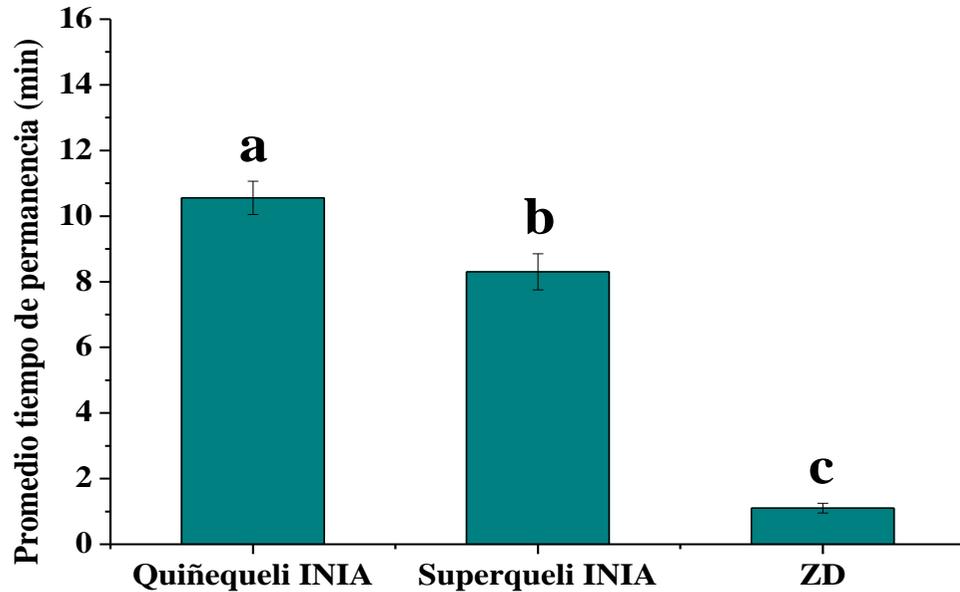


Figura 25. Respuestas olfatométrica *N. bakeri* adultos hacia volátiles de la parte aérea de dos cultivares de trébol rosado. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Conover-Inman ($P \leq 0,05$). Zona de decisión (ZD). N = 15.

4.2.3 Relación entre antibiosis y antixenosis. Los resultados de desempeño no fueron una combinación de ambos parámetros (antibiosis y antixenosis), lo cual se sustenta en la descripción realizada por O'Neal & Hodgson (2010) quienes describen que las plantas pueden presentar una o más formas de resistencia frente a los insectos. Por otra parte, existen reportes en donde ambas modalidades de resistencia se presentaron en conjunto como es el caso del áfido del guisante *Acyrtosiphon pisum* (Zeng *et al.*, 1994) evaluado en diferentes cultivares de trébol rosado. Sin embargo, cabe destacar que según Mancía (1972), los componentes de resistencia de las plantas son complejos y existen diversas interacciones entre diversos factores, lo que influye en que no siempre las distintas formas de resistencia se comporten en sincronía. Por otra parte los resultados de antixenosis son coincidentes con los datos obtenidos de terreno donde Superqueli INIA presenta significativamente una menor abundancia de áfidos en comparación a los cultivares y líneas experimentales (Fig. 22).

5. CONCLUSIONES

Los aumentos poblacionales de áfidos ocurren a finales de primavera y periodo estival.

Las especies determinadas en trébol rosado correspondieron a *Acyrtosiphon pisum*, *A. kondoi*, *Therioaphis trifolii* y *Nearctaphis bakeri*.

La especie con mayor abundancia correspondió a *Nearctaphis bakeri*, mientras que las otras especies presentarían solo una infestación ocasional.

Los áfidos evaluados no mostraron una respuesta de antibiosis frente a los cultivares y línea experimental de trébol rosado.

El cultivar Superqueli INIA es menos infestado por el áfido *N. bakeri* bajo condiciones de campo.

El cultivar Quiñequeli INIA podría tener una mayor susceptibilidad de ser infestado por *N. bakeri* evaluados en ensayos de antixenosis bajo condiciones de laboratorio.

La modalidad de resistencia presente en las plantas de trébol rosado fue solo de antixenosis (no preferencia) por el nuevo cultivar Superqueli INIA.

Antibiosis y antixenosis no se comportaron combinadamente en los cultivares de trébol rosado evaluados frente a la infestación del áfido *N. bakeri*.

Debido a los resultados de antixenosis y los muestreos de campo se acepta la hipótesis planteada en este estudio.

6. RESUMEN

El trébol rosado es una importante forrajera en la Región de La Araucanía tanto por su forraje como por la exportación de su semilla. En los últimos años se ha observado aumentos poblacionales de áfidos en semilleros y ensayos experimentales (Ortega, 2011-12¹). Los áfidos son insectos perjudiciales para las plantas cultivadas debido al daño directo e indirecto que causan a su hospedero. Debido a esto se planteó la siguiente pregunta de investigación; ¿Existen diferencias en el desempeño de los áfidos entre los cultivares y líneas experimentales de trébol rosado en la Región de La Araucanía? Para determinar las especies de áfidos presentes en cultivares y líneas experimentales de trébol rosado y para evaluar el desempeño de estos mismos, se realizaron muestreos periódicos en plantas de trébol rosado entre febrero 2012 y enero 2013, para posteriormente realizar ensayos de antibiosis y antixenosis del áfido *Nearctaphis bakeri* el cual se encontró en mayor proporción en los muestreos periódicos. Además, los muestreos de terreno revelaron que los áfidos se encuentran significativamente en menor población sobre el cultivar Superqueli INIA en comparación a los cultivares y líneas experimentales. Los ensayos de antibiosis demostraron que el áfido *N. bakeri* no tuvo diferencias significativas en la tasa reproductiva al alimentarse de los cultivares Quiñequeli INIA, Superqueli INIA, Redqueli INIA y la línea experimental Syn Int V, mientras que en el ensayo de antixenosis el áfido *N. bakeri* mostró una preferencia por el cultivar Quiñequeli INIA al compararlo con el cultivar Superqueli INIA. Por lo tanto, el cultivar Superqueli INIA presentaría resistencia hacia el áfido *N. bakeri* por medio de un mecanismo de antixenosis.

¹ Dr. Fernando Ortega, 2011-2012. Fitomejorador de Forrajeras, INIA Carillanca, Temuco, Chile. Comunicación personal.

7. SUMMARY

Red clover is an important forage in the Region of La Araucanía because both forage and seed production. In recent years, the aphid populations on red clover plants have increased in seedbeds and experimental assays (Ortega, 2011-12¹). Aphids are harmful insects to plant growth because of both direct and indirect damage they cause to their host. Hence, this work aimed to answer the following research question: Are there differences in the performance of aphids among cultivars and experimental lines of red clover in the Region of La Araucanía? periodical sampling were developed between February 2012 and January 2013 with aims of: a) determining the aphid species settling on cultivars and experimental lines of red clover plants, b) studying the antibiosis and antixenosis effect on the main aphid identified in the field survey, *Nearctaphis bakeri*. The results showed that Superqueli INIA was the red clover with the lower *N. bakeri* population than the rest of cultivars and experimental lines. Moreover, antibiosis assays showed that the aphid *N. bakeri* had a similar reproductive rate on the cultivars Quiñequeli INIA, Superqueli INIA, Redqueli INIA and the experimental line Syn Int V. On the contrary antixenosis experiments revealed that *N. bakeri* showed a significant preference by cultivar Quiñequeli INIA compared to Superqueli INIA. Therefore, the fact that Superqueli INIA was the with lower aphid population in the field, and parallel did not select this cultivar Superqueli INIA in laboratory experiment, suggest that Superqueli INIA present resistance to *N. bakeri* through an antixenosis mechanism.

¹ Dr. Fernando Ortega, 2011-2012. Fitomejorador de Forrajes, INIA Carillanca, Temuco, Chile. Comunicación personal.

8. LITERATURA CITADA

- Aguilera, A. 1990.** Ficha entomológica para la IX región de La Araucanía. *Therioaphis trifolii* (Monell) (Homoptera: Aphididae). IPA Carillanca, 1: 45-46.
- Aguilera, A. & Ortega, F. 1994.** Determinación de *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach) (Homoptera: Aphididae) en leguminosas forrajeras para la Novena Región de Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Agricultura Técnica. 54(1): 65-67.
- Aguilera, A., C., Pacheco & J. Guerrero. 1994.** Fluctuación poblacional de *Myzocallis coryli* (Goeze) (Homoptera: Aphididae) en la IX Región de Chile. Rev. Per. Ent. 37:105-106.
- Aguilera, A., E. Cisternas, M. Gerding & H. Norambuena, 1996.** Plagas de las praderas. En: Ruiz, I. (Ed.). Praderas para Chile. 2a Edición. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA. Ministerio de Agricultura. 734 pp. 310-339.
- Alarcón, D., F. Ortega, F. Perich, F. Pardo, L. Parra & A. Quiroz. 2010.** Relationship Between Radical Infestation of *Hylastinus obscurus* (Marsham) and the Yield of Cultivars and Experimental Lines of Red Clover (*Trifolium pratense* L.). R.C. Suelo Nutri. Veg. 10:115-125.
- Almeida, A., E. Mouro & J. Bartolomeu. 2007.** Wether, Cultivar and Density-Dependent Processes Influence on Aphid in Alfalfa. Instituto Agronómico de Campinas. Rev. Ciencias Agronómicas. 66: 285-290.
- Artigas, J. 1994.** Entomología Económica. Insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos). Vol. 1. Ediciones Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 1126 p.
- Avendaño, R. 1965.** La variedad Quiñequeli y su evaluación con respectos a algunos tréboles rosados corrientes. Agricultura Técnica. 25: 167-171.
- Barnett, O. W. & S. Diachun. 1985.** Virus diseases of clovers. In N. L. Taylos (ed.), Clover Science and Technology. ASA-CSSA-SSSA. Mono. 25: 235-268.
- Blackman, R. L. & V. F. Eastop. 2000.** Aphids on the world's crops. An identification and information guide. Second Edition, Wiley & Sons Ltd. London, UK. 1024 p.
- Bowen, R. & R. T., Plumb. 1979.** The occurrence and effects of red clover necrotic virus in red clover (*Trifolium pratense*). Ann. Appl. Biol. 92: 227-236.

- Bowley, S. R., N.L. Taylor & C. T. Dougherty. 1984.** Physiology and Morphology of Red Clover. Department of Crop Science, University of Guelph. Guelph, Ontario, Canada. *Avances in Agronomy*. Vol. 37.
- Carrillo, R., & N. Mundaca. 1974.** Biología de *Hylastinus obscurus* (Marsham) Col., Scolytidae. *Agricultura Técnica*. Téc. 34, 28-35.
- De Zutter N., K. Audenaert, G. Haesaert G. & G. Smagghe. 2012.** Preference of Cereal Aphids for Different Varieties of Winter Wheat. *Arthropod-Plant Interactions* 6:345–350.
- Demagnet, F. 2008.** Manual de Especies Forrajera y Manejo de Pastoreo. Universidad de La Frontera. Edición Área Agropecuaria Watt´s S.A. 199 p.
- Dethier, G. 1951.** Taste sensitivity to compounds of homologous series. *Am J Physiol*. 165(1):247–250.
- Douglas, J. S. 1976.** Advanced Guide to Hydroponics. Drake Publishers. New York.
- Dreves, A. 1990.** Seasonal Abundance, Distribution, and Migration of the Clover Aphid, *Nearctaphis bakeri* (Cowen) in Red Clover. Tesis Master of Science, Oregon State University. pp. 54.
- Dughetti, A. 2012.** Pulgones. Clave para Identificar las Formas Ápteras que Atacan a los Cereales. Estación Experimental Agropecuaria – INTA Hilario Ascasubi. 44 p.
- Edwardson, J. R & R.G. Christie. 1986.** Viruses reported to infect certain forage legumes. In J. R. Edwardson & R.G. Christie (eds.), *Viruses Infecting Forage Legumes*. S127 Mono. 14 Vol 3:B1-B6. Florida Agric. Expt. Sta. Gainesville.
- Estay, P. 2003.** Control de pulgones en Hortalizas. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Centro Regional de Investigación (CRI) La Platina. Santiago, Chile.
- Flynn, D., E., Sudderth, & F., Bazzaz. 2004.** Effects of aphid herbivory on biomass and leaf-level physiology of *Solanum dulcamara* under elevated temperature and CO₂. *Environmental and Experimental Botany*. 56: 10-18.
- Fuentes, E., R. Muñoz & H. Niemeyer. 1997.** Diversidad de afidos (Hemiptera: Aphididae) en Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*. 70: 531-542.
- Gotelli, N. 2001.** A primer of ecology, 3rd ed. Sinauer, Sunderland, MA.
- Graham, J. & R. Newton. 1959.** Relationship between root feeding insects and incidence of crown and root in red clover. *Plant Dis. Res.* 43: 1114-1116.

Guerin, P. M., E. Stadler, & H. R. Buser. 1983. Identification of host plant attractants for the carrot fly, *Psila rosae*. J. Chem. Ecol. 9: 843-861.

Gyenge, J., E. Trumper & J. Edelstein. 1999. Diseño de planes de Muestreo con Niveles Fijos de Precisión del Pulgón Manchado de la Alfalfa, *Therioaphis trifolii* Monell (Homoptera: Aphididae) en Alfalfa (*Medicago sativa* L.). An. Soc. Entomol. 28: 729-737.

Hodgson, W. 2007. Aphids in alfalfa. Utah University Extension and Utah Plant Pest. Diagnostic Laboratory. 5 p.

Hueichapán, A. 2011. Interacción Insecto-Planta entre *Aegorhinus nodipennis* Hope (Coleoptera: Curculionidae) y *Corylus avellana* L. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. 54 p.

Khadhair, A. H., R.C. Sinha & J. F. Peterson. 1984. Effect of whit clover mosaic virus infection on various processes relevant to symbiotic N₂ tixation in red clover. Canad. J. Bot. 62: 38-43.

Klein, C. & F. Waterhouse. 2000. The distribution and importance of arthropods associated with agriculture and forestry in Chile (Distribución e importancia de los artrópodos asociados a la agricultura y silvicultura en Chile). ACIAR Monograph No. 68, 234 p.

Kogan, M. and E. F. Ortman. 1978. Antixenosis-a new term proposed to replace Painter's "Non-Preference" modality of resistance. Bulletin of the Entomological Society of America 24, 175-176.

Lapis, E. B., & J. H. Borden. 1993. Olfactory discrimination by *Heteropsylla cubana* (Homoptera, Psyllidae) between susceptible and resistant species of *Leucaena* (Leguminosae). J. Chem. Ecol. 19: 83-90.

Mancía, J. 1972. Siete variedades de frijol tolerantes al picudo de la vaina (*Apion Godmani* Wagn.). Programa Cooperativo Centroamericano de Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. Leguminosas de grano. XVIII Reunión Anual. Managua, Nicaragua. Serie N°1.pp.151-160.

Márquez, J. 2005. Técnicas de colecta y preservación de insectos. Laboratorio de Sistemática Animal. Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa, 37: 385-408.

Mazuferi, E., A., Maidana, P., Fichetti, L., Hansen & D., Avalos. 2011. Abundancia y riqueza específica de pulgones (Hemiptera: Aphididae) y sus parasitoides en diferentes genotipos y estados fenológicos del garbanzo. AGRISCIENTIA, 2: 99-108.

Medredov, D. 2009. Genomio No Genoma. Disponible en es.scribd.com/doc/14179584/Genomio-No-Genoma. Conectado el 15 de julio de 2013.

Niño, L., M., Cermeli, F., Becerra & M., Flores. 2001. Fluctuación Poblacional de Áfidos Alados en Dos Localidades Productoras de Papa en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 12:57-71

O'Neal, M., & E., Hodgson. 2010. Soybean Aphid Management Field Guide. Iowa State University. University Extension. Pag. 47.

Ortega, F. & J. Levío. 2011a. SuperQueli INIA, Nuevo Cultivar Chileno de Trébol Rosado (*Trifolium pratense* L.). I. Origen y Descripción Morfológica. Instituto de Investigaciones agropecuarias, CRI-Carillanca. XXXVI Congreso Sociedad Chilena de Producción Animal. Punta Arenas, Chile. ISSN: 0718-3682.

Ortega, F. & J. Levío. 2011b. SuperQueli INIA, Nuevo Cultivar Chileno de Trébol Rosado (*Trifolium pratense* L.). II. Comportamiento Agronómico en La Araucanía, Chile. Instituto de Investigaciones agropecuarias, CRI-Carillanca. XXXVI Congreso Sociedad Chilena de Producción Animal. Punta Arenas, Chile. ISSN: 0718-3682.

Ortega, F. 2009. Forrajeras chilenas para el crecimiento sustentable bovino y ovino. *Rev. Tierra Adentro*. Temuco, Chile. 85: 20-21.

Ortega, F., Galdames, R. Aguilera, A. Romero, O. Ruiz, I. Soto, P. & A. Torres. 2003. Redqueli INIA, nuevo cultivar sintético de Trébol Rosado. Centro Regional de Investigación Carillanca. *Agricultura Técnica*. 63 (2): 207-211.

Pacheco, B., L. Parra, F. Ortega, J. Tampe & A. Quiroz. 2012. Olfactometric response of Aphids toward volatiles of three ecotypes (Quiñequeli INIA, Superqueli INIA and Syn II Pre III) of red clover (*Trifolium pratense* L.). 2nd Meeting of the ALAEQ. Sociedad Latino Americana de Ecología Química. Huerta Grande-Córdoba, Argentina.

Palma, R., A., Mutis, L., Manosalva, R., Ceballos & A., Quiroz. 2012. Behavioral and electrophysiological responses of *Hylastinus obscurus* to volatiles released from the roots of *Trifolium pratense* (L.). *Journal of Soil Science and Nutrition*, 12: 183-193

Painter, H. 1951. Insect resistance to crop plants. The Mc Millan Co., New York, pp 151.

Quiroz, A., F., Ortega, C., C., Ramírez, L., J., Wadhams & K., Pinilla. 2005. Response of the Beetle *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleoptera: Scolytidae) to Red Clover (*Trifolium pratense* L.) Volatiles in a Laboratory Olfatometer. *Environmental entomology* 34: 690-695.

Quiroz, A. & H. M. Niemeyer. 1997. Olfatometer-Assesd Responses of Aphid *Rhopalosiphum padi* to Wheat and Oat Volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 1.

Quiroz, A. & H. M. Niemeyer. 1998. Activity of Enantiomers of Sulcatol on Apteræ of *Rhopalosiphum padi*. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 2.

Rossanigo, R. 1997. Alfalfa: Panorama varietal; Plagas; control malezas; Utilización y manejo. INTA, Centro Regional Córdoba. Invernada bovina en zonas mixtas. *Agro 2 de Córdoba*. 1: 6-36.

Silva, A., E. Mouro, & J. Bartolomeu. 2007. Weather, cultivar and density-dependent processes influence on aphid in Alfalfa. Universidad Autónoma del Estado de México. *Bragantia: revista de ciencias agronómicas*. Instituto Agronómico de Campinas. Campinas, Brasil. 66: 285-290.

Smith, M. 2005. Plant Resistance to Arthropods. Molecular and Conventional Approaches. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 423 pp.

Smith, R.R. & D.P. Maxwell. 1971. Productivity and quality response of red clover (*Trifolium pratense* L.) infected with bean yellow mosaic virus. *Crop Sci.* 11: 272-274.

Stary, P., F. Rodríguez & G. Remaudiere. 1994. Asociación planta-áfido-parasitoide (Hom., Aphidoidea; Hom., Aphidiidae), en la zona central de Chile. *Agricultura Técnica* 54: 46-53.

Stary, P., M., Gerding, H., Norambuena & G., Remaudiere. 1993. Environmental research on aphid parasitoid biocontrol agents in Chile (Hym., Aphidiidae; Hom., Aphidoidea). *Journal of Applied Entomology*. 115:292-306.

Steiner, J. & Alderman, S. 2003. Red clover seed production: VI. Effect and Economics of soil pH Adjusted by lime application. *Crop. Sci.* 43; 624-630.

Teetes, G. 1996. Resistencia de las Plantas a los Insectos: Un Componente Fundamental del MIP. Radcliffe: Libro Mundial de MIP. Departamento de Entomología, Universidad de Minnesota. TX 77843-2475. <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/TeetesSp.htm>

Torres, A. & J. Dumont. 1991. Producción y Utilización de Trébol Rosado (*Trifolium pratense* L.). Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Estación experimental Remehue. Osorno, Chile. Serie Remehue N° 13.

Undersander, D., R. Smith, K. Kelling, J. Jerry, G. Worf, J. Wedberg, J. Peters, P. Hoffman and R. Shaver. 1914. Red clover. Establishment, Management and Utilization. University of Wisconsin-Madison. Department of Agriculture. 13 pp.

Verdugo J., T. Mendez, S. Ortiz-Martinez, R. Cumsille & C. Ramirez. 2012. Variation in Resistance Mechanism to the Green Peach Aphid Among Different *Prunus persica* Commercial Cultivars. Instituto de Biología y Biotecnología vegetal, Universidad de Talca. Talca, Chile. *J. Econ. Entomol.* 105 (5): 1844-1855.

Zeng, F., A., Pederson, F., M. Davis & M., Ellsbury. 1994. Modalities of Resistance of N-2 Red Clover Germplasm to Pea Aphid (Homoptera: Aphidiae). Crop Science Research Laboratory. Mississippi State, USA. *J. Agric. Entomol.* 11(4): 349-359.

9. AGRADECIMIENTOS

El autor de esta tesis agradece al Laboratorio de Química Ecológica, Universidad de La Frontera, Laboratorio de Fitomejoramiento de Forrajeras (INIA Carillanca) y al Proyecto FONDECYT N°1100812.

10. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de solución nutritiva (Long Anshon), adaptada de acuerdo a los rangos de concentración óptimos de cada nutriente según Douglas (1976).

Recipiente para un Volumen final de 10 litros (bidón)

Macroelementos;

Agregar por separado y asegurando su completa solubilización los siguientes compuestos en 5 litros de agua desmineralizada: 8,08 gramos de KNO_3 ; 9,44 gramos de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 1,62 gramos de NaH_2PO_4 .

Posteriormente se adicionan 200 ml de agua desmineralizada conteniendo 3,68 gramos de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, de tal forma de evitar que precipite el sulfato de calcio.

Oligoelementos;

1) Se prepara una solución de un litro en agua desmineralizada con los siguientes compuestos: 664 mg $\text{MnSO}_4 \text{H}_2\text{O}$; 160 mg $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 145 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 310 mg de H_3BO_3 , 590 mg de NaCl .

2) Posteriormente se agregan 50 ml de solución de molibdato de amonio (solución 1).

3) Se completa a volumen de un litro.

4) 100 ml de la solución de oligoelementos se adicionan a la solución de macroelementos.

5) Se completa a un volumen final de 10 litros.

6) Finalmente se añade 20 ml de la solución de sulfato ferroso y se agita (solución 2).

Solución 1: En un matraz de litro diluir 1,12 mg de Molibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua desmineralizada, conservar en el refrigerador.

Solución 2: En un matraz aforado de 100 ml se preparó una solución de fosfato ferroso heptahidratado al 1 % (1 g diluir en 100 ml de agua desmineralizada).

Anexo 2. Concentración final de cada nutriente (Macroelementos y oligoelementos) en solución nutritiva final (10 litros), en ppm.

NUTRIENTE	ppm
Nitrógeno	260,06
Calcio	160,00
Magnesio	74,83
Fósforo	75,29
Potasio	312,00
Azufre	104,05
Cobre	0,41
Boro	0,55
Hierro	8,12
Manganeso	2,16
Molibdeno	0,03
Zinc	0,33

Anexo 3. Temperatura y humedad relativa en la cámara de cultivo (datos tomados por data Logger), crianza de áfidos para olfatometrias (antixenosis).

	Promedio	Desde	Hasta	Unidad	Alarma
Temperatura	22,08±6,95	08-08-2012	12-11-2012	Grados Celsius (°C)	0°C-35°C
Humedad relativa	45,15±11,90	09-08-2012	13-11-2012	Humedad relativa (%HR)	35-75%HR
Punto de rocío	8,92±3,06	10-08-2012	14-11-2012	-	-

Anexo 4. Resumen de fechas de actividades para evaluación de desempeño bajo condiciones de laboratorio, Quiñequeli INIA (Q), Redqueli INIA (R), Superqueli INIA (S) y Syn Int V (L1).

Objetivo		Siembra	Trasplante	Inoculación	Transferencia de Áfidos	Conteo de Áfidos
Crianza	Q	3-mar	18-mar	28-mar	7-abr	-
	Q	15-mar	28-mar	7-abr	17-abr	-
	Q	24-mar	7-abr	17-abr	27-abr	-
Desempeño	Q	2-abr	17-abr	27-abr	-	12-may
	R	2-abr	17-abr	27-abr	-	12-may
	S	2-abr	17-abr	27-abr	-	12-may
	L1	2-abr	17-abr	27-abr	-	12-may

Anexo 5. Temperatura y humedad relativa en la cámara de cultivo (datos tomados por data Logger), crianza y desempeño de antibiosis.

	Promedio	Desde	Hasta	Unidad	Alarma
Temperatura	25,50±1,36	03-03-2012	12-05-2012	Grados Celsius (°C)	0-35°C
Humedad relativa	48,99± 4,59	03-03-2012	12-05-2012	Humedad relativa (%HR)	35-75%HR
Punto de rocío	13,89±2,02	03-03-2012	12-05-2012	-	-

Anexo 6. Data Logger. Grafica original antes de trasladar datos a planilla excel.

