

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



RELACIÓN ENTRE LA INFESTACIÓN RADICAL DE *Hylastinus obscurus* (MARSHAM) Y LA PRODUCCIÓN DE CULTIVARES 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.

DANIELA LORENA ALARCÓN ARANEDA

TEMUCO – CHILE

2010

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



RELACIÓN ENTRE LA INFESTACIÓN RADICAL DE *Hylastinus obscurus* (MARSHAM) Y LA PRODUCCIÓN DE CULTIVARES 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.

DANIELA LORENA ALARCÓN ARANEDA
PROFESOR GUIA: ANDRÉS QUIROZ CORTEZ
TEMUCO – CHILE

2010

TITULO “Relación entre la infestación radical de *Hylastinus obscurus* (MARSHAM) y la producción de cultivares y líneas experimentales de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.)”

PROFESOR GUÍA:

Andrés Eduardo Quiroz Cortez

Doctor en Química

Departamento de Ciencias Químicas y
Recursos Naturales

Universidad de La Frontera

PROFESOR CONSEJERO:

Fernando Ortega Klose

Ingeniero Agrónomo Ph D

Centro Regional de Investigación INIA
Carillanca

CALIFICACIÓN PROMEDIO DE TESIS:

*A mis padres, por su constante
esfuerzo y ayuda para guiarme
en el comienzo de mi carrera...*

ÍNDICE

Capitulo		Pag.
1.	INTRODUCCIÓN	2
2.	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	4
2.1	Trébol rosado (<i>Trifolium pratense</i> L.)	4
2.2	<i>Hylastinus obscurus</i> (Marsham)	4
2.3	Mejoramiento genético del trébol rosado	6
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1	Ubicación del ensayo y diseño experimental	7
3.2	Características agroclimáticas del lugar del ensayo	7
3.3	Establecimiento y manejo del trébol rosado	8
3.4	Obtención de <i>Hylastinus obscurus</i> desde raíces de trébol rosado	8
3.5	Diámetro de corona y longitud de raíz principal	9
3.6	Evaluación de parámetros agronómicos	9
3.7	Análisis estadístico	10
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	11
5.	CONCLUSIONES	19
6.	AGRADECIMIENTOS	20
7.	RESUMEN	21
8.	SUMMARY	22
9.	LITERATURA CITADA	23
10.	ANEXOS	26

INDICE DE TABLAS

Tabla		Pag.
1	Cultivares y líneas experimentales de <i>T. pratense</i> evaluadas En condiciones de campo	7
2	Fechas de evaluación del trébol rosado	10

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pag.
1	Letra A: Estado de larva; Letra B: adulto de <i>H. obscurus</i>	5
2	Rendimiento de forraje (t MS ha-1) de cultivares y líneas experimentales de trébol rosado durante dos temporadas establecidas en la Estación Experimental INIA Carillanca.	11
3	Población de <i>H. obscurus</i> y rendimiento de forraje de diferentes cultivares y líneas experimentales de trébol rosado en la primera temporada (2007-2008).	12
4	Rendimiento de forraje total de trébol rosado de dos temporadas (2007-2008 y 2008-2009) y número de individuos de <i>Hylastinus obscurus</i> por planta	14
5	Rendimiento de forraje total de trébol rosado de dos temporadas (2007-2008 y 2008-2009) y número de individuos de <i>Hylastinus obscurus</i> por planta.	15
6	Densidad de siembra de cultivares y líneas experimentales de trébol rosado determinada después de dos temporadas de evaluación y población <i>H. obscurus</i>	16
7	Cubierta de vegetación y población de plantas de cultivares y líneas experimentales de trébol rosado, evaluadas en dos temporadas	17
8	Raíz de diámetro de corona de los cultivares y líneas experimentales de trébol rosado durante dos temporadas (2007-2008 y 2008-2009)	18

1. INTRODUCCIÓN

El trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) es una importante leguminosa forrajera producida en aproximadamente 4 millones de hectáreas en las regiones templadas del mundo y posee múltiples usos en rotaciones agrícolas (Riday, 2009). En Chile, es un recurso valioso para la producción animal y para la industria de las semillas, con exportaciones en la última década de 700 a 1700 toneladas al año y 100.000 hectáreas cultivadas, lo que corresponde al 20% del total de las praderas sembradas (Ortega, 2009). Los principales usos de ésta leguminosa son en praderas de rotación corta (Carrileo & Rojas, 1987), pastoreo y corte (heno, ensilaje y soiling). A pesar de que el trébol rosado es considerado botánicamente como una planta perenne, los niveles de producción declinan dramáticamente después del segundo año de establecida la pradera (Cuevas & Balocchi, 1983; Leath, 1985; Steiner & Alderman, 2003), debido a la alta mortalidad de plantas (Ortega, 1996; Rodas & Ortega, 1997). Entre los factores que influyen en ésta mortalidad se encuentra la pudrición de la raíz y la infestación radical por el barrenador de la raíz *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae) (Graham & Newton, 1959; Carrillo & Mundaca, 1974). Este escolítido es la plaga más importante del trébol rosado (*T. pratense*) en todo el mundo (Steiner & Alderman, 2003). Tanto larvas como adultos causan daño en las raíces del trébol, provocando una reducción significativa en los niveles de producción y persistencia de ésta leguminosa al segundo año pos siembra (Cuevas & Balocchi, 1983; Steiner & Alderman, 2003). El daño en las raíces afecta a las reservas de hidratos de carbono y desarrollo de tallos y hojas, lo que se traduce en la destrucción total de la planta (Graham & Newton, 1959; Koehler *et al.*, 1961, Carrillo & Mundaca, 1974; Matamala, 1976). Según Aguilera (1995), la intensidad del ataque puede llegar entre el 70 y el 100% de las plantas al segundo y tercer año de establecido el trébol rosado.

En 1989, se puso en marcha en el Centro Regional de Investigación Carillanca del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), un programa de mejoramiento de trébol rosado, con el objetivo de mejorar la sobrevivencia de plantas, rendimiento de forraje y persistencia en comparación con el diploide chileno Quiñequeli-INIA lanzado en 1962. El primer cultivar sintético desarrollado, Redqueli-INIA, fue lanzado en 1997.

Estudios previos han demostrado que *H. obscurus* responde a estímulos químicos de la planta (Quiroz *et al.*, 2005; Tapia *et al.*, 2005; Tapia *et al.*, 2007), lo que evidencia que éste insecto es capaz de reconocer su huésped mediante la detección de compuestos químicos liberados de la parte aéreas y raíces del trébol rosado. Estos resultados sugieren que el insecto está fuertemente asociado a las raíces del trébol rosado, debido a los compuestos químicos producidos a partir de las raíces. No hay estudios sobre la dinámica poblacional de *H. obscurus* y su uso potencial para la selección de nuevos cultivares de trébol rosado.

Por lo tanto, éste trabajo de investigación tiene como objetivo general relacionar la población *H. obscurus* con la evaluación de parámetros agronómicos convencionales en el mejoramiento de trébol rosado de dos cultivares, Redqueli-INIA y Quiñequeli-INIA, y siete líneas experimentales propuestas por INIA Carillanca.

Los objetivos específicos asociados al objetivo general son los siguientes:

- Evaluar la producción de materia seca de dos cultivares y siete líneas experimentales.
- Determinar densidad y cobertura de plantas de trébol rosado.
- Relacionar el diámetro de corona de raíz con la edad de las plantas.
- Determinar la población de *Hylastinus obscurus* en los cultivares y líneas experimentales estudiados.
- Encontrar una correlación entre la población de *H. obscurus* y algún parámetro agronómico

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Trébol rosado (*Trifolium pratense* L.)

El trébol rosado es una importante especie leguminosa forrajera constituyendo en Chile la especie monofítica de mayor superficie establecida, estimándose ésta en 100.000 ha (Ortega *et al.*, 2005). El rendimiento promedio anual de esta forrajera es de siete ton/ha aproximadamente (Torres & Sierra, 1991). En la región de La Araucanía el rendimiento alcanza las 12,4 toneladas MS/ha (Romero, 1980).

Dentro de los usos más frecuentes al que está destinado el trébol rosado es en pradera de rotación corta (Catrileo & Rojas, 1987), pastoreo y corte.

Aunque trébol rosado esta descrito como una especie perenne de vida corta (Cuevas & Balocchi, 1983; Leath, 1985; Steiner & Alderman, 2003), la persistencia de este cultivar se ha ido perdiendo, pudiendo llegar a durar solo una temporada (Ortega y Galdames (1991) lo que está fuertemente asociado a la presencia de algunas plagas y enfermedades provocadas por hongos fitopatógenos.

Los hongos que comúnmente afectan al trébol rosado son: mancha foliar de *Stemphylium*, septeriosis, fusariosis y esclerotiniosis. Por lo que hongos pertenecientes al género *Fusarium* han sido responsables de la pudrición de la corona y de las raíces del trébol rosado (Leath *et al.*, 1971).

Las plagas asociadas al trébol rosado son muy pocas, debido a que muchos de ellos son solo ocasionalmente dañinos y no alcanzan densidades de importancia económica para el cultivo. Dentro de las especies que se comportan como plagas destaca la cuncunilla negra (*Dallaca pallens* B.) y el barrenador de la raíz del trébol rosado (*Hylastinus obscurus* Marsham). Éste último en conjunto con patógenos del suelo limita fuertemente la persistencia del trébol rosado.

2.2 *Hylastinus obscurus* (Marsham)

La especie *H. obscurus* pertenece al orden Coleoptera, familia Scolytidae y al género *Hylastinus* (Bright & Stark, 1973; Gonzales *et al.*, 1973). Es una especie

monovoltina, donde el vuelo de dispersión ocurre entre Octubre y Diciembre. Éste inverna en estado adulto y en menor grado en estado de larva y pupa en las galerías formadas en las raíces de trébol rosado (Carrillo & Mundaca, 1974; Matamala, 1976).

El daño que provoca *H. obscurus* en las raíces ocurre en los estados de larva y adulto exclusivamente (Koelher *et al.*, 1961). Éstos se alimentan de tejidos radicales, corteza y cambium, lo que además facilita la entrada de agentes patógenos al interior de la raíz.

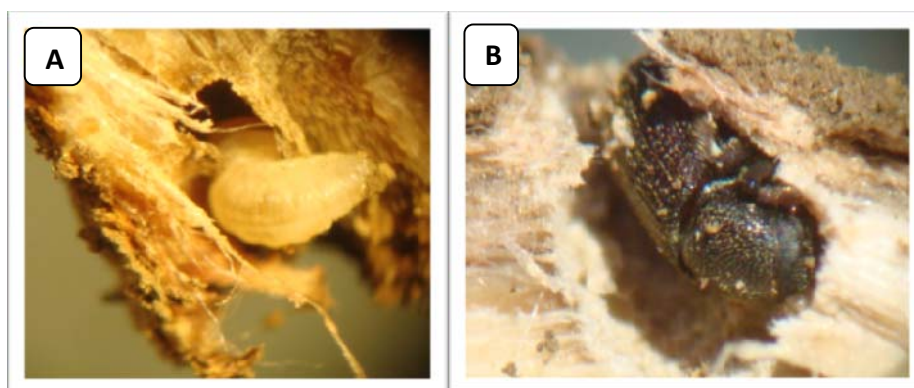


Figura 1. Letra A: Estado de larva; Letra B: adulto de *H. obscurus*

La intensidad del ataque varía según la edad de la pradera, ya que al segundo año de establecido el trébol rosado, el ataque de *H. obscurus* oscila entre 70 a 100%. (Carrillo & Mundaca, 1974)

Buttery *et al.*, 1984 asocia la interacción entre trébol rosado e *H. obscurus* a la liberación de compuestos volátiles emitidos por la planta. Con el tiempo se ha demostrado que individuos de *H. obscurus* responden a volátiles liberados de plantas entre 1,5 a 2,5 años de edad (Quiroz *et al.*, 2005)

En la actualidad no existe ningún control curativo que sea efectivo para la eliminación de *H. obscuru* debido a que el largo periodo de vuelo de éste insecto y su ubicación al interior de las raíces limita la eficiencia de los productos químicos (Torres & Sierra, 1991). Según Aguilera *et al.*, 1996 un tipo de control cultural basado en rotación de cultivos disminuiría la infestación. En cuanto al control biológico, Prado (1991), indica que no existen controladores biológicos de *H. obscurus* en Chile.

2.3 Mejoramiento genético del trébol rosado.

A fines de la década del 50 el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Chile, inició un trabajo de mejoramiento genético de trébol rosado, el cual permitió en 1962 liberar al mercado el cultivar diploide Quiñequeli-INIA (Avendaño, 1965). En el año 1987 se comenzó un nuevo programa de fitomejoramiento de la especie en el Centro Regional de Investigación Carillanca, del INIA, con el objetivo de mejorar la sobrevivencia de plantas, comportamiento sanitario y rendimiento de forraje en relación a Quiñequeli-INIA. De lo anterior se dio paso al nuevo cultivar Redqueli-INIA (Ortega *et al.*, 2003).

Debido a lo anterior el Laboratorio de Ecología Química de la Universidad de La Frontera ha iniciado una serie de investigaciones basadas en el estudio de la conducta de *H. obscurus*, concentrándose principalmente en la interacción que existe entre el hospedero y el insecto, integrando el uso de semioquímicos y aspectos agronómicos. Paralelo a esto, el INIA Carillanca ha realizado una investigación basada en el mejoramiento de los cultivares de trébol rosado buscando una mayor persistencia en el tiempo. Esto a través de la evaluación de líneas experimentales, donde se integra el comportamiento que tiene *H. obscurus* en cada línea experimental.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del ensayo y diseño experimental.

El ensayo fue establecido en la primavera de 2007 en las dependencias del Centro Regional de Investigación INIA Carillanca, ubicado en la Región de La Araucanía, Provincia de Cautín, 38 ° 41 'de latitud sur y 72 ° 25' de longitud oeste y 200 msnm. Se establecieron dos cultivares y siete líneas experimentales (Tabla 1) distribuidas en un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. El tamaño de las parcelas fue de 1,8 x 7 m cada una.

Tabla 1. Cultivares y líneas experimentales de *T. pratense* evaluadas en condiciones de campo.

Nombre o código	Cultivar o línea	Origen
Quiñequeli-INIA	Cultivar	INIA-Carillanca (Avendaño, 1965)
Redqueli-INIA	Cultivar	INIA-Carillanca (Ortega <i>et al.</i> , 2003)
Syn Pre I	Línea experimental	INIA-Carillanca (bajo evaluación)
Syn IV	Línea experimental	INIA-Carillanca (bajo evaluación)
Syn Pre II	Línea experimental	INIA-Carillanca (bajo evaluación)
Syn Int IV	Línea experimental	INIA-Carillanca (bajo evaluación)
Syn Pre III	Línea experimental	INIA-Carillanca (bajo evaluación)
Syn Int V	Línea experimental	INIA-Carillanca (bajo evaluación)
Syn Int VI	Línea experimental	INIA-Carillanca (bajo evaluación)

3.2 Características agroclimáticas del lugar del ensayo.

El clima de la zona agroecológica de Precordillera, se caracteriza por presentar temperaturas anuales promedio de 10° C, con una máxima en Enero de 21,5° C y una mínima en julio de 2,3° C. Existe anualmente una suma de 2.346 horas de frío y una sumatoria térmica de temperatura base de 5° C de 1.394° día. Su régimen hídrico está

caracterizado por una precipitación anual de 1.394 mm, siendo mayo el mes más lluvioso con 236,6 mm. El periodo libre de heladas se ubica entre enero y febrero. El suelo corresponde a un Andisol, perteneciente a la serie de Vilcún, familia Temuco, clasificado como Medial, Music, Entic, Dystrandept. Tiene una profundidad agrícola de 80 cm aproximadamente y una topografía plana con pendiente de 0-2%.

3.3 Establecimiento y manejo del trébol rosado.

Los cultivares y líneas experimentales fueron sembradas el 12 de septiembre de 2007, en un suelo previamente preparado con una sembradora manual Planet Junior. Se sembró en línea con una separación de 20 cm. La dosis de siembra fue de 15 kg ha⁻¹, con *Rhizobium* inoculado en la semilla. Los fertilizantes se aplicaron anualmente de acuerdo con el análisis de suelos. La fertilización que se aplicó a la siembra consistió en 140 kg P₂O₅ ha⁻¹, 151 kg K₂O ha⁻¹, 5 kg S ha⁻¹; 1 kg Mg ha⁻¹; 65 kg Na ha⁻¹; 153 kg CaO ha⁻¹. La fertilización de mantenimiento de la segunda temporada fue de 140 kg de P₂O₅ ha⁻¹ y 200 kg K₂O ha⁻¹. El ensayo se regó cinco veces en la primera temporada (de enero a marzo de 2008) y ocho veces durante la segunda temporada (de noviembre de 2008 a marzo de 2009). Las malezas residentes fueron retiradas en forma mecánica no aplicando herbicida.

3.4 Obtención de *Hylastinus obscurus* (Marsham) desde raíces de trébol rosado.

Los insectos se recolectaron mensualmente a partir de noviembre de 2007 hasta mayo de 2009. Se colectaron alrededor de 12 plantas en promedio de cada cultivar y línea experimental a partir de las tres repeticiones. Las plantas enteras (parte aérea y radical) se almacenaron en bolsas de papel para luego ser trasladadas al Laboratorio de Ecología Química de la Universidad de La Frontera. En el laboratorio la parte radical fue separada de la parte aérea, y se cortó la raíz cuidadosamente con un bisturí para evaluar la presencia de larvas y adultos de *H. obscurus*, las que fueron registradas. Estos estudios se iniciaron cuando las plantas cumplieron 4 meses de edad.

3.5 Diámetro de corona y longitud de raíz principal

El diámetro de corona y longitud de la raíz principal se evaluó en las mismas plantas utilizadas para constatar la presencia de *H. obscurus*. El diámetro fue medido con un calibrador Vernier y la longitud de la raíz con una regla metálica. Las evaluaciones se realizaron con el número total de plantas recolectadas en el campo.

3.6 Evaluación de parámetros agronómicos

Se realizaron siete cortes (Tabla 2) para la determinación de materia seca (MS). Tres cortes se realizaron durante la primera temporada de crecimiento (2007-2008), y cuatro en la segunda temporada (2008-2009). Debido a que el trébol rosado es una especie perenne de clima templado, el inicio de la segunda temporada de crecimiento fue durante la primavera de 2008. Los cortes se hicieron según los siguientes criterios: 1) 5 a 10% de floración o 2) altura de la planta entre 40 a 50 cm. La parte aérea fue cortada dejando un residuo de aproximadamente 5 cm del suelo. Se evaluaron 1,2 m² de la parte central de cada parcela, con dos cuadrantes de 0,6 m² cada uno, el que fue utilizado para determinar los siguientes parámetros agronómicos: a) población de plantas expresado como número de plantas por m², b) follaje, determinando el porcentaje de espacios vacíos de al menos 10 cm entre plantas que se encuentran en 1,2 m² y c) MS a partir de una submuestra de 150 a 200 gramos que fue secado en una estufa a 65 ° C durante 48 horas, para obtener el rendimiento en t MS ha⁻¹.

Tabla 2. Fechas de evaluación del trébol rosado.

Cortes	Temporada	Fecha	Edad de las plantas (meses)
1 ^{er}	1	2 - enero - 2008	5
2 ^{do}	1	20 - febrero - 2008	6
3 ^{er}	1	31 – marzo-2008	7
1 ^{er}	2	16 – octubre – 2008	14
2 ^{do}	2	11 – diciembre – 2008	16
3 ^{er}	2	9 – febrero – 2009	18
4 ^{to}	2	5 – mayo - 2009	21

3.7 Análisis estadístico

La normalidad de los datos se determinó mediante la prueba de Shapiro Wilk. Al no cumplir con este supuesto estadístico, se realizó la prueba no paramétrica de Friedman seguido de la prueba Conover ($P < 0,05$). Para el análisis estadístico se utilizó el número acumulado de larvas y adultos de *H. obscurus*. Los parámetros agronómicos fueron analizados por ANOVA ($P < 0,05$) y la separación de los grupos se determinó por LSD ($P < 0,05$). La correlación entre los parámetros se realizó con la prueba de Kendall y Spearman ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

El rendimiento total de materia seca de trébol rosado durante las dos temporadas se muestra en la Figura 2.

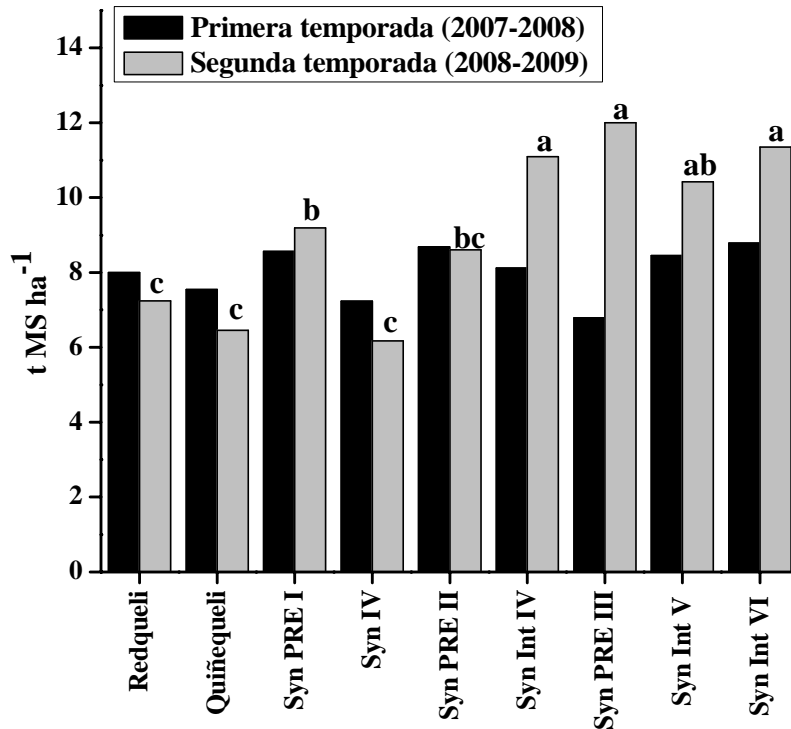


Figura 2. Rendimiento de forraje (t MS ha⁻¹) de cultivares y líneas experimentales de trébol rosado durante dos temporadas establecidas en la Estación Experimental INIA Carillanca.

Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre cultivares y líneas experimentales en la primera temporada. Sin embargo, las líneas experimentales Syn Int IV, Syn Pre III, Syn Int V y Syn Int VI lograron ser más productivas que las variedades Redqueli-INIA y Quiñequeli-INIA en la segunda temporada. Ortega *et al.* (2003) informó una producción de 17,4 y 15 t MS ha⁻¹ para Redqueli-INIA y Quiñequeli INIA, respectivamente, como rendimiento total durante las dos primeras temporadas. En este estudio, ambos cultivares fueron menos productivos, 15,3 y 14 t MS ha⁻¹, respectivamente.

Sin embargo, el rendimiento de MS de la línea experimental Syn Int VI (20,3 t MS ha⁻¹) en la segunda temporada fue comparable a la producción de forraje de Redqueli (21,1 t MS ha⁻¹) reportado por Ortega *et al.* (2003) después de tres temporadas.

No hubo diferencias significativas de rendimiento de forraje entre cultivares y líneas experimentales en los tres cortes en la primera temporada (Fig. 3).

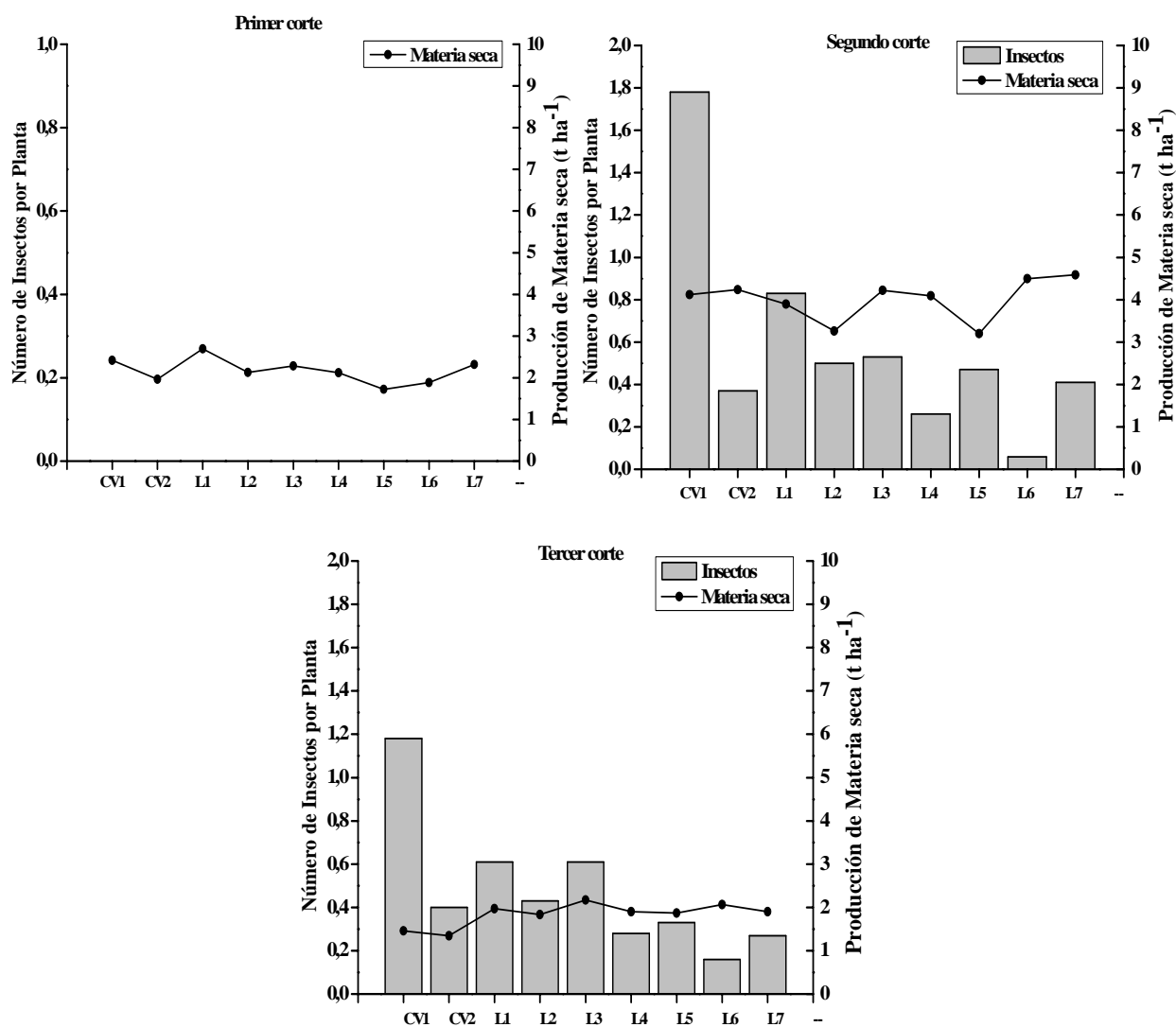


Figura 3. Población de *H. obscurus* y rendimiento de forraje de diferentes cultivares y líneas experimentales de trébol rosado en la primera temporada (2007-2008). CV1=

Redqueli, CV2= Quiñequeli, L1= Syn Pre I, L2= Syn-IV, L3= Syn Pre II, L4= Syn Int IV, L5= Syn Pre III, L6= Syn Int V, L7= Syn Int VI.

Las plantas no mostraron infestación por *H. obscurus* en el primer corte, cuando las plantas tenían 5 meses de edad. Sin embargo, el inicio de la colonización por *H. obscurus* se inició en todos los cultivares y líneas experimentales cuando las plantas alcanzaron seis meses de edad. Esto difiere de lo reportado por Gonzales (1989), quién indica que este escolítido no ataca al trébol rosado durante el primer año de establecido. Nuestros resultados indicaron que los insectos fueron encontrados a fines de febrero, después del período de vuelo y cuando el insecto deposita los huevos en la base de la corona de las plantas de trébol rosado (Matamala, 1976; Aguilera, 1989). Teniendo en cuenta la presencia de *H. obscurus*, no hubo diferencias significativas entre cultivares y líneas experimentales en el segundo y tercer corte, lo que se podría deber a que el porcentaje de raíces dañadas representaron en promedio sólo el 26% de las raíces muestreadas de cada cultivar y línea experimental evaluada. Sin embargo, hubo una tendencia en el cultivar Redqueli-INIA, donde se encontró un mayor número de *H. obscurus* durante el segundo y tercer corte, con un promedio por planta de 1,78 y 1,18 respectivamente.

En el segundo (diciembre de 2008) y tercero (febrero de 2009) corte de la segunda temporada, Syn Int VI, Syn Int V y Syn Pre III fueron más productivos que los cultivares Redqueli-INIA y Quiñequeli INIA. El bajo rendimiento mostrado por todos los cultivares y líneas experimentales en el cuarto corte, 1,8 t MS ha⁻¹, se podría explicar debido a que esta evaluación se llevó a cabo durante otoño (mayo 2009). Según Demanet (2008) la disminución en la producción de materia seca es común durante el invierno, lo que indicaría por que Quiñequeli-INIA y Redqueli-INIA produjeron sólo entre el 9 y el 11% de la producción total anual de materia seca, obteniéndose la producción máxima durante el verano. La población de *H. obscurus* aumento significativamente en los cultivares y líneas experimentales evaluadas en la segunda temporada (Fig. 4), coincidiendo con Carrillo y Mundaca (1974) quienes informaron que durante el segundo año de establecimiento, el ataque de *H. obscurus* alcanza el 70% de las plantas de trébol rosado de la pradera. Todo esto es coincidente con lo reportado por Newton & Graham (1960), quienes sugieren que la

población de *H. obscurus* aumenta después de la primavera, causando un efecto negativo en la producción de MS.

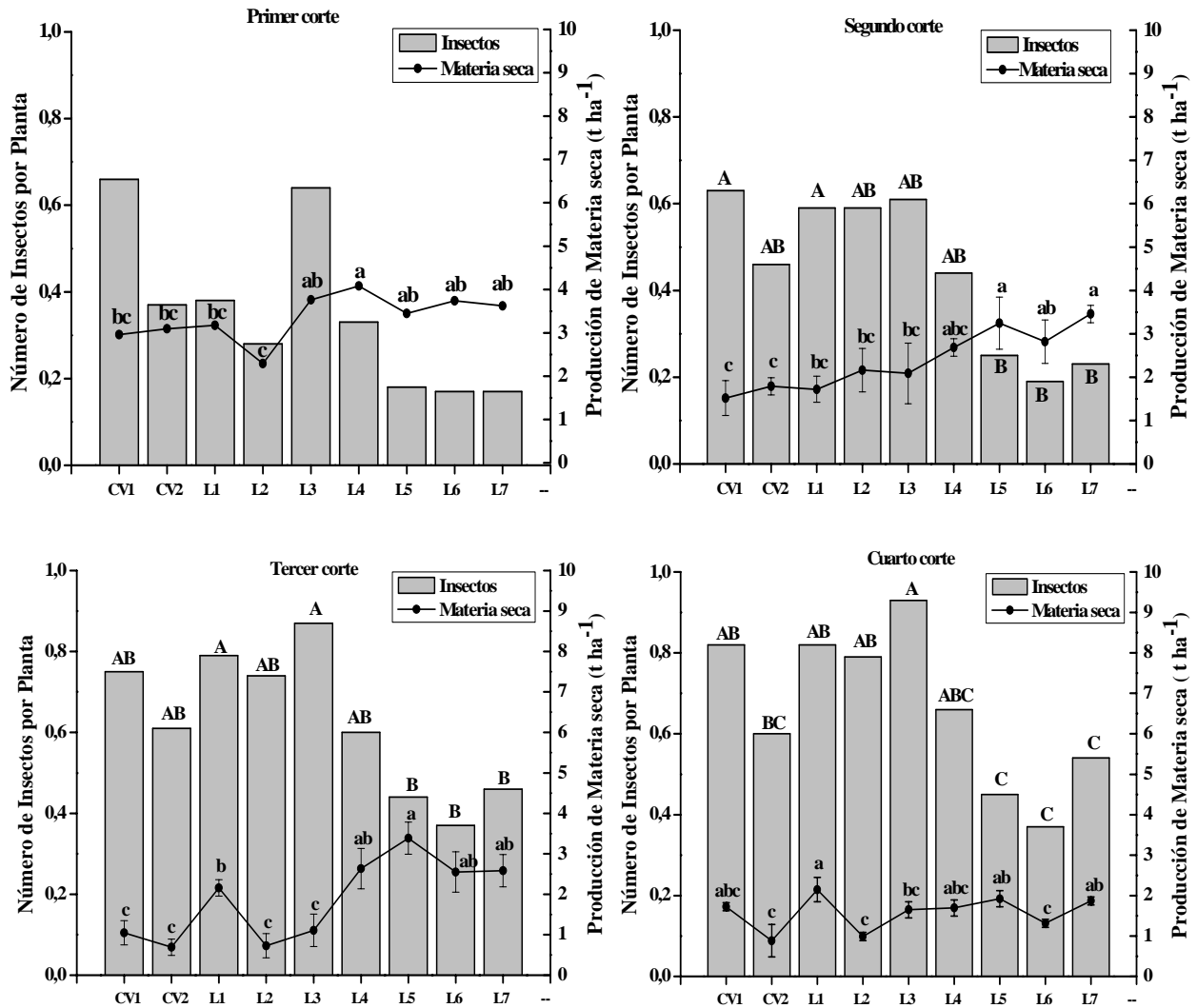


Figura 4. Rendimiento de forraje total de trébol rosado de dos temporadas (2007-2008 y 2008-2009) y número de individuos de *Hylastinus obscurus* por planta. Letras distintas indican diferencias significativas basadas en el análisis de ANOVA y prueba de LSD ($P < 0,05$).

El efecto negativo de la población de *H. obscurus* sobre el rendimiento de MS se muestra claramente en la Figura 5. Las líneas experimentales Syn Pre III, y Syn Int V y Syn

Int VI muestran significativamente la más alta producción de forraje y las poblaciones más bajas *H. obscurus*. Por lo tanto de esta figura se pueden distinguir dos grupos: a) uno formado por las líneas resistentes Syn Pre III, Syn Int V y Syn Int VI y b) Redqueli-INIA y Quiñequeli-INIA y el resto de líneas experimentales, incluyendo la línea tolerante, Syn Pre I. El segundo grupo es significativamente más atacado por *H. obscurus* que el primer grupo.

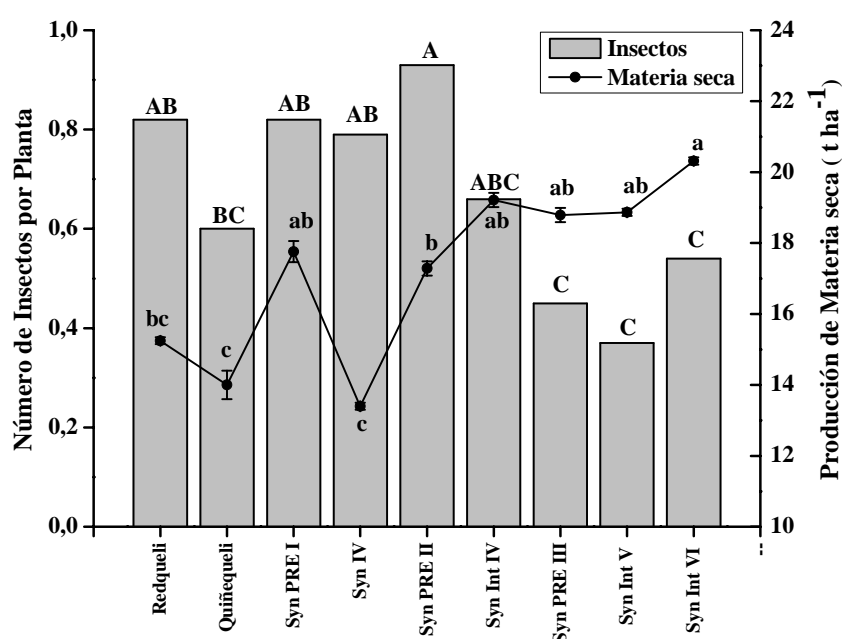


Figura 5. Rendimiento de forraje total de trébol rosado de dos temporadas (2007-2008 y 2008-2009) y número de individuos de *Hylastinus obscurus* por planta. Letras distintas indican diferencias significativas basadas en el análisis de ANOVA y prueba de LSD ($P < 0,05$).

El mismo efecto se observó cuando la población de insectos se relacionó con la densidad de plantas (Fig. 6). Un análisis de correlación de ambos parámetros mostraron que la población de *H. obscurus* afecta negativamente a la densidad de plantas (Prueba de Kendal, $P = 0,0467$; Prueba de Spearman, $P < 0,033$). Debido a este comportamiento, estas líneas experimentales podrían ser consideradas resistentes al ataque barrenador de la raíz.

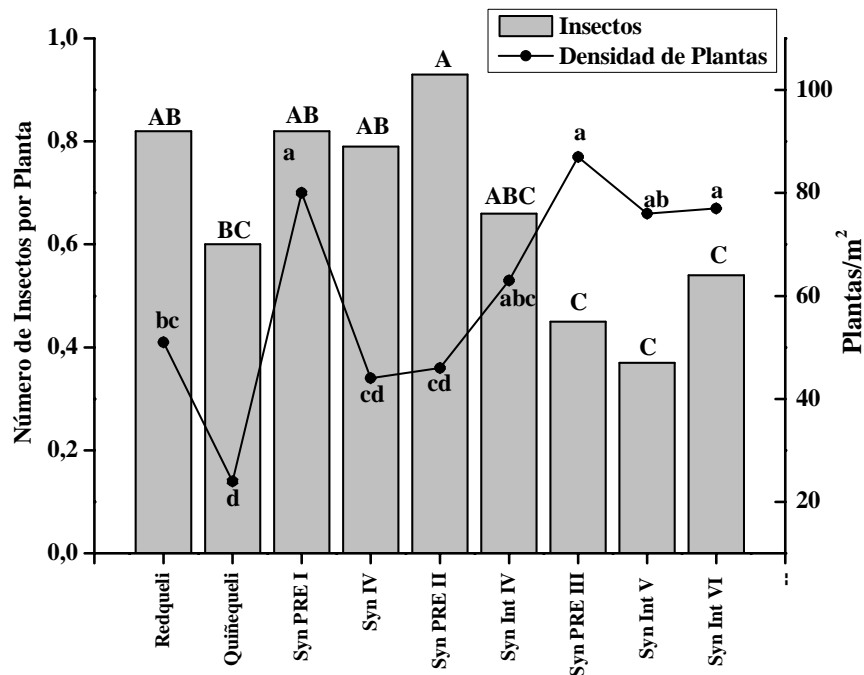


Figura 6. Densidad de siembra de cultivares y líneas experimentales de trébol rosado determinada después de dos temporadas de evaluación y población *H. obscurus*. Letras distintas indican diferencias significativas basadas en el análisis de ANOVA y prueba de LSD ($P < 0,05$).

Al contrario, los cultivares Redqueli-INIA, Quiñequeli-INIA y el resto de líneas experimentales mostraron resultados inversos. Sin embargo, Syn Pre I y Syn Int IV mostraron un rendimiento de forraje similar a las líneas sintéticas mencionadas arriba, pero con una carga mucho mayor de insectos (Fig. 5). Por otra parte, Syn Pre I mostró una cobertura de forraje y densidad de plantas resistentes a las líneas Syn Pre III, Syn Int V y Syn Int VI (Fig. 7). Estos datos sugieren que Syn Pre I podría ser considerada como tolerante a *H. obscurus*, de acuerdo con la definición reportado por Rosenthal & Agrawal (1994) y Strauss & Agrawal (1999), y podría por lo tanto, ser evaluado en entornos artificiales y naturales (Tiffin & Inouye, 2000).

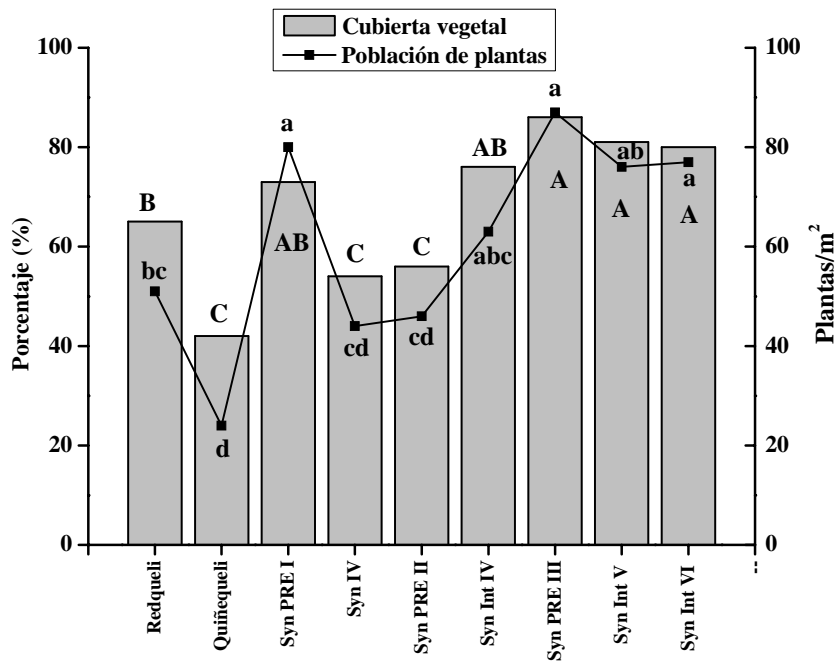


Figura 7. Cubierta de vegetación y población de plantas de cultivares y líneas experimentales de trébol rosado, evaluadas en dos temporadas. Letras distintas indican diferencias significativas basadas en el análisis de ANOVA y prueba de LSD ($P < 0,05$).

Los cultivares Redqueli-INIA y Quiñequeli-INIA mostraron un patrón de aumento creciente del diámetro de la corona de la raíz, en comparación con las líneas resistentes (fig.8). Esta conclusión se ajusta a la existencia de un coeficiente positivo de correlación entre el diámetro de la corona de las plantas de trébol rosado y el número de individuos de *H. obscurus* encontrado dentro de las raíces (Matamala, 1976).

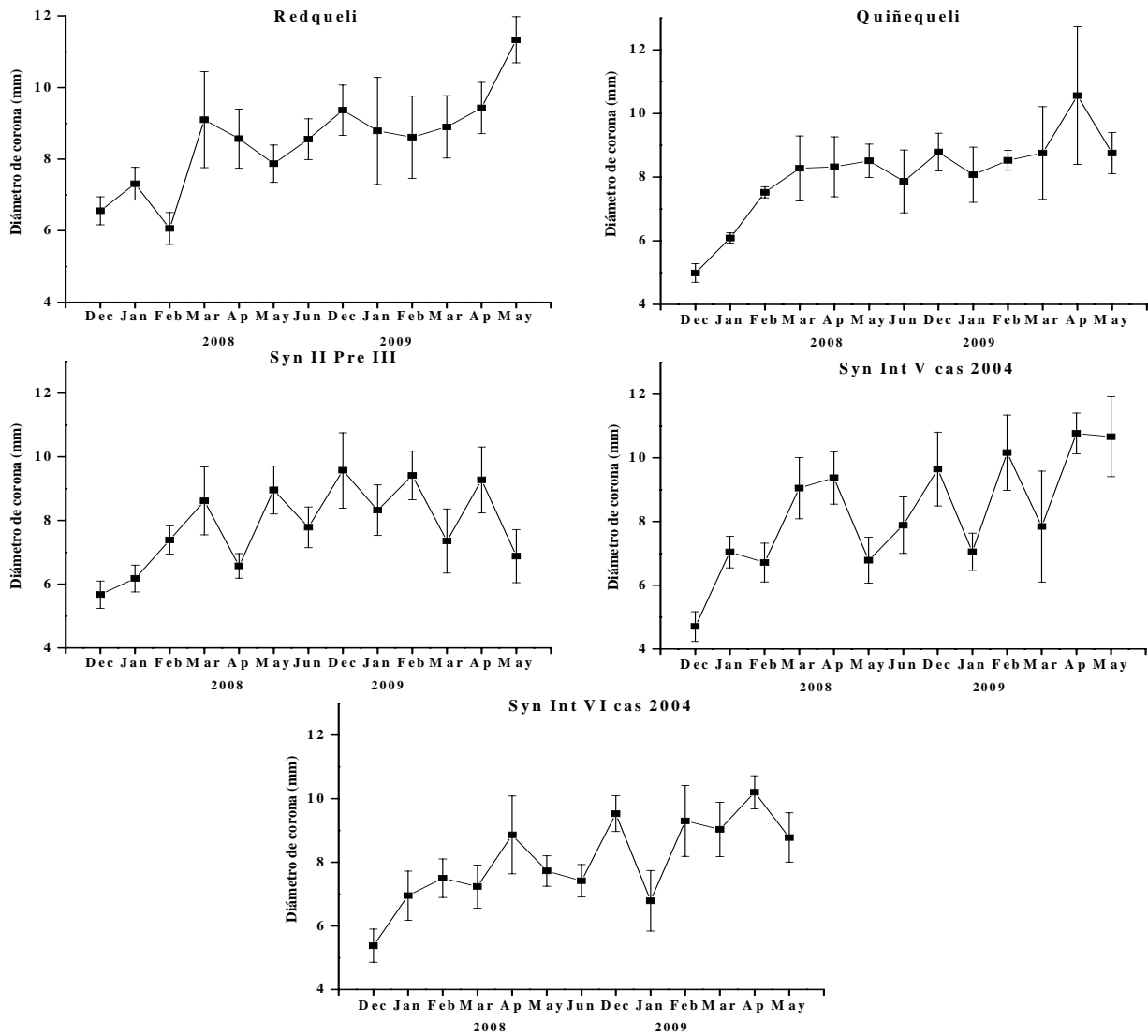


Figura 8. Raíz de diámetro de corona de los cultivares y líneas experimentales de trébol rosado durante dos temporadas (2007-2008 y 2008-2009). Barras indican error estándar.

5. CONCLUSIONES

Los objetivos primarios de mejoramiento se focalizan en el aumento de la producción de MS y la persistencia. El enfoque clásico incorpora procedimientos para la determinación de la biomasa vegetal y la densidad de plantas. Nuestro estudio presenta una nueva herramienta biológica complementaria para la selección de nuevas variedades de trébol rosado, como la evaluación de la población de *H. obscurus*.

Los resultados mostraron una relación inversa entre el rendimiento de forraje y la población *H. obscurus*.

La evaluación de este parámetro biológico ha permitido identificar tres posibles nuevas variedades: Syn Pre III, Syn Int V y Synt Int VI. Estas líneas experimentales mostraron una menor población de *H. obscurus* y el mayor rendimiento de forraje de trébol rosado en las condiciones experimentales.

6. AGRADECIMIENTOS

El autor de esta Tesis, agradece a los Proyectos FONDECYT 1070270 e INIA 500302-70, por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

A mis padres, que siempre han guiado mi camino y han permitido que pueda lograr mis sueños que también son suyos. Sin su apoyo y constante esfuerzo éste sueño nunca hubiese sido real.

Además quisiera agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Ecología Química de la Universidad de La Frontera, ya que de alguna u otra forma aportaron muchos granitos de arena para que ésta tesis saliera adelante.

A Eduardo, que siempre ha sido un pilar fundamental desde que llego a mi vida brindándome su apoyo y amor durante toda mi etapa universitaria.

7. RESUMEN

El trébol rosado (*Trifolium pratense* L), es una importante especie forrajera que crece sola o en mezcla en regiones templadas del mundo. Esta especie está adaptada a un amplio tipo de suelos, niveles de pH, condiciones ambientales y de manejo. Sin embargo, su principal limitante es la falta de persistencia relacionada con la alta mortalidad de las plantas. En Chile, el principal factor biótico que afecta la sobrevivencia de plantas es el barrenador de raíces *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleóptera; Scolytidae). En 1989, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Carillanca, comenzó un programa de mejoramiento del trébol rosado con el objetivo de mejorar la sobrevivencia de plantas, el rendimiento y la persistencia. En el 2002, comenzó una línea de investigación relacionada con el estudio de la interacción entre *H. obscurus* y su hospedero, el trébol rosado. Este trabajo describe brevemente el mejoramiento obtenido después de 20 años de iniciado el programa de INIA Carillanca y la importancia de la población de *H. obscurus* con miras al rendimiento de forraje. Los experimentos fueron conducidos en INIA-Carillanca (Temuco-Chile) bajo condiciones de riego. Se comparó el rendimiento de forraje de nuevas líneas experimentales y Redqueli-INIA con Quiñequeli-INIA y se determinó la población de *H. obscurus* en las raíces de trébol rosado entre Noviembre 2007 y Mayo 2009. El estudio demostró que al aumentar el número de *H. obscurus* en la raíz disminuye la producción de materia seca, encontrando diferencias significativas ($P \leq 0,05$) a partir del tercer corte de la primera temporada. Sin embargo, el escolítido comenzó a colonizar las raíces de todas las plantas evaluadas al segundo corte de la primera temporada, cuando las plantas presentaban seis meses de edad. También hubo diferencias significativas entre el número de insectos encontrados en cada cultivar y línea experimental.

8. SUMMARY

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is a valuable forage legume grown alone or in mixture with grasses in temperate regions of the world. Red clover is adapted to a wide range of soil types, pH levels, environmental and management conditions. However, the main limitation of this species is the lack of persistence related to the high mortality of plants. In Chile the main biotic factor affecting survival of plants is the root borer *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleóptera; Scolytidae). In 1989, a red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding program was started at Carillanca Research Center of the Institute of Agricultural Research (INIA), Chile, with the main objectives of improving the survival of plants, forage yield and persistence. In 2002 a research line to study the interaction between the root borer and the plant was started. This paper describes briefly the improvement obtained in survival of young plants after twenty years of breeding and the importance of root borer population regarding forage yield. Experiments were conducted at Carillanca Research Center under irrigated conditions, comparing under cutting the dry matter yield of new synthetic lines and Redqueli-INIA with Quiñequeli-INIA. Root borer population in red clover roots was determined between November 2007 and May 2009, coinciding with the evaluation of dry matter production. The study revealed that there were experimental lines producing significant more amounts of dry matter, and between the number of insects found in each cultivar and the experimental lines ($P \leq 0.05$). Moreover, we report the first evidence that *H. obscurus* start the colonization of red clover plant of 6-month-old. This is the first report showing an inverse relation between dry matter yield of red clover and root borer population.

9. LITERATURA CITADA

Aguilera, A. 1989. Ficha entomológica de la IX Región de La Araucanía, *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleóptera: Scolytidae). Instituto de Investigaciones Agropecuarias. IPA-Carillanca. Chile.

Aguilera, A. 1995. Control selectivo de plagas en frutales de la zona sur. pp. 141-180. En Aguilera, A., Andrade, O., Díaz, J., Espinoza, N., Galdames, R. Norambuena, H. (eds). Seminario de Protección Vegetal. INIA Carillanca (Temuco, Chile).

Aguilera, A., Cisternas, E., Gerding, M., Norambuena, H. 1996. Plagas de las praderas, 309-339, en Ministerio de Agricultura, Chile. I. Ruiz (ed.). Praderas para Chile.

Avendaño, R. 1965. La variedad Quiñequeli y su evaluación con respecto a algunos tréboles rosados corrientes. Agricultura Técnica 25,167-171

Becerra, L., Soto, P. 1982. Calendario de utilización de trébol rosado. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Investigación y Progreso Agrícola (IPA), Estación Experimental Quilamapu, Chillán, Chile.

Carrillo, R., Mundaca, N. 1974. Biología de *Hylastinus obscurus* (Marsham) Col., Scolytidae. Agricultura Técnica. 34, 28-35.

Catrileo, A., Rojas, C. 1987. Ganado y cultivos: posibilidades para enfrentar mejor las variaciones del mercado. IPA Carillanca. (Temuco, Chile). 6 (1):9-11.

Cuevas, E., Balocchi, O. 1983. Producción de forraje. Instituto de Producción Animal. Universidad Austral de Chile. Serie B7. (Valdivia, Chile). 210 p.

Demanet, R. 2008. Manual de especies forrajeras y manejo pastoreo. Plan Desarrollo Lechero Watt's.

Gonzales, R. 1989. Insectos y Ácaros de importancia Agrícola y Cuarentenaria en Chile. Editora Ograma S.A. 310 p.

Graham, J., Newton, R. 1959. Relationship between root feeding insects and incidence of crown and root rot in red clover. Plant Dis. Res. 43, 1114-1116.

- Koehler, C. S, Gyrisco, G. G, Newsom, L. D., Schwardt, H. H. 1961.** Biology and control of the clover root borer, *Hylastinus obscurus* (Marsham). Mem. Cornell Agriculture Experiment Station 376. 36.
- Leath, K. 1985.** General diseases. In: N.L. Taylor, Editor, Clover Science and Technology, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 205-233.
- Matamala, J. 1976.** Biología, niveles de infestación, daño y combate químico de *Hylastinus obscurus* (Marsham). Tesis Ing. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 51 p.
- Quiroz, A., F. Ortega, C. Ramírez, L.J. Whadams, K. Pinilla. 2005.** Response of the beetle *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleóptera: Scolytidae) to red clover (*Trifolium pratense* L.) volatiles in a laboratory olfactometer. Environ. Entomol. 34, 690-695.
- Ortega, F. 1996.** Variation in mortality, yield and persistence of red clover (*Trifolium pratense* L.). 255 p. Tesis Ph.D. University of Wales, Aberystwyth, United Kingdom.
- Ortega, F., Galdames, F., Aguilera A., Romero, O., Ruiz, I., Soto, P., Torres, A. 2003.** Redqueli-INIA, nuevo cultivar sintético de trébol rosado. Agricultura Técnica. 63, 207-211.
- Ortega, F. 2009.** Fitomejoramiento de trébol Rosado: Variedades para el mercado nacional y de exportación. Tierra Adentro. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Número 85. pp 21.
- Rhodes, I., and F. Ortega. 1997.** Plant breeding achievements and prospects, Forag p. 15-27. In J.R. Weddell (ed.). Seeds of Progress. British Grassland Society, Symposium #31, Nottingham, Inglaterra.
- Riday, H. 2009.** Correlations between visual biomass scores and forage yield in space planted red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding nurseries. Euphytica. 170, 339-345.
- Rosenthal, J.P and Agrawal, P.M. 1994.** Terrestrial plant tolerance to herbivory. Trends Ecol. Evol. 9, 145-148.

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

Strauss, S.Y. and Agrawal, A.A. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol. Evol.* 14, 179-185.

Tapia, S., F. Pardo, F. Perich, A. Quiroz. 2005. Clover root borer *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleóptera: Scolytidae) has no preference for volatiles from root extract of disease infected red clover. *Acta Agri. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* 55, 158-160.

Tapia, T., F. Perich, F. Pardo, G. Palma, A. Quiroz. 2007. Identification of volatiles from differently aged red clover (*Trifolium pratense*) root extracts and behavioural responses of clover root borer (*Hylastinus obscurus*) (Marsham) (Coleóptera: Scolytidae) to them. *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 61-67.

Tiffin, P. and Inouye, B.D. 2000. Measuring tolerant to herbivory: Accuracy and precision of estimates made using natural versus imposed damage. *Evolution* 54, 1024-1029.

Torres, A. and Sierra, C. 1991. Descripción, adaptación y establecimiento. En: Torres y Dumont (ed.). Producción y Utilización de Trébol Rosado. Serie Remehue N°13. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Remehue, Osorno, Chile. 98 p.

10. ANEXO

RELATIONSHIP BETWEEN RADICAL INFESTATION OF *Hylastinus obscurus* (MARSHAM) AND THE YIELD OF CULTIVARS AND EXPERIMENTAL LINES OF RED CLOVER (*Trifolium pratense* L.)

Daniela Alarcón¹, Fernando Ortega², Fernando Perich³, Fernando Pardo³,
Leonardo Parra¹ and Andrés Quiroz^{1,3,4*}

¹Laboratorio de Ecología Química, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA Carillanca, Chile. Casilla postal 58-D, Temuco, Chile. ³Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ⁴Center of Chemical Ecology of Terrestrial and Aquatic Systems (CETAS), BIOREN, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. *Corresponding author: aquiroz@ufro.cl

ABSTRACT

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is a valuable forage legume grown alone or in mixture with grasses in temperate regions of the world. Red clover is adapted to a wide range of soil types, pH levels, environmental and management conditions. However, the main limitation of this species is the lack of persistence related to the high mortality of plants. In Chile the main biotic factor affecting survival of plants is the root borer *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera; Scolytidae). In 1989, a red clover (*T. pratense* L.) breeding program was started at Carillanca Research Center of the Institute of Agricultural Research (INIA), Chile, with the main objectives of improving the survival of plants, forage yield and persistence. In 2002 a research line to study the interaction between the root borer and the plant was started. This paper describes briefly the improvement obtained in survival of young plants after twenty years of breeding and the importance of root borer population regarding forage yield. Experiments were conducted at Carillanca Research Center under irrigated conditions, comparing under cutting the dry matter yield of new synthetic lines and Redqueli-INIA with Quiñequeli-INIA. The experimental lines Syn Int IV, Syn Pre III, Syn Int V and Syn Int VI were more productive than the cultivars Redqueli-INIA and Quiñequeli-INIA at the second season. The evaluation of the biological parameter allowed identifying a tolerant line, Syn Pre I, and three potential new varieties: Syn Pre III, Syn Int V and Syn Int VI. This is the first report showing an inverse relation between dry matter yield of red clover and root borer population ($P \leq 0.05$). Moreover, we report the first evidence that *H. obscurus* start the colonization of red clover plant of 6-month-old.

Keywords: *Hylastinus obscurus*, red clover, plant population, breeding, dry matter yield

INTRODUCTION

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is an important forage legume grown on approximately 4 million hectares in temperate regions of the world and serves a multiple purpose in agricultural

rotations (Riday, 2009). In Chile is a valuable resource for animal production and for the seed industry with exports in the last decade from 700 to 1700 tons year⁻¹ and 100,000 ha cultivated,

corresponding to 20% of the total sown pastures (Ortega, 2009). This is a legume that is used primarily in short-rotation pastures (Catrileo and Rojas, 1987), grazing and cutting (hay, silage and soiling). Although red clover is botanically considered a perennial plant, production levels decline dramatically two years after sowing (Cuevas and Balocchi, 1983; Leath, 1985; Steiner and Alderman, 2003), determined by the high mortality of plants (Ortega, 1996; Rhodes and Ortega, 1997).

Factors involved in mortality of red clover plants include root rot and infestations by the root borer *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleoptera: Scolytidae) (Graham and Newton, 1959; Carrillo and Mundaca, 1974). This scolytid is the most important pests of red clover (*T. pratense*) throughout the world (Steiner and Alderman, 2003). Both larvae and adults bore and feed into the roots causing a significant reduction in production levels and persistence of red clover stands within two years after sowing (Cuevas and Balocchi, 1983; Steiner and Alderman, 2003). The root damage affects the carbohydrate reserves, the development of stems and leaves, resulting in a total destruction of the plant (Graham and Newton, 1959; Koehler *et al.*, 1961; Carrillo and Mundaca, 1974; Matamala, 1976). The intensity of the attack can reach between 70 and 100% of plants affected the second and third year of clover established (Aguilera, 1995). In 1989, a red clover breeding program was launched at Carillanca Research Center of the Institute of Agricultural Research (INIA-Chile), with the main objectives of improving the survival of plants, forage yield and persistence compared to the Chilean diploid and double cut cultivar Quiñequeli-INIA released in 1962. The first new synthetic developed was Redqueli-INIA, cultivar released in 1997.

Previous studies have shown that *H. obscurus* respond to chemical stimulus from the plant (Quiroz *et al.*, 2005; Tapia *et al.*, 2005; Tapia *et al.*, 2007), evidencing that this insect is able to recognize their host by detecting chemical compounds released from both aerial and root parts of red clover plant. These results suggested that the insect is strongly associated to the red clover roots because of the chemical compounds released from roots.

There are not studies about the population dynamic of *H. obscurus* and their potential influence on selecting new red clover cultivars. This research aims to relate *H. obscurus* population with conventional agronomical parameters evaluated in red clover breeding, such as dry matter yield, forage cover and plant density. Moreover, crown diameter of red clover plant was incorporated in these evaluation, because its relation with the oviposition behavior of *H. obscurus*. The research was performed studying two cultivars, Redqueli-INIA and Quiñequeli-INIA, and seven experimental lines proposed by INIA Carillanca.

MATERIALS AND METHODS

Location of the research and experimental design

A trial was established in spring of 2007 at INIA Carillanca Research Center, located in the Araucanía Region, Cautín Province, 38° 41' south latitude and 72° 25' west longitude and 200 m.s.n.m. Quiñequeli-INIA and Redqueli-INIA cultivars (Avendaño, 1965; Ortega *et al.*, 2003) and 7 experimental lines under evaluation (Syn Pre I, Syn IV, Syn Pre II, Syn Int IV, Syn Pre III, Syn Int V and Syn Int VI) were distributed in an experimental design of randomized

complete blocks with three replicates. Plot size was 1.8 x 7 m each.

Agroclimatic characteristics of the research site

The climate is characterized by annual average temperatures of 10°C, with a maximum mean monthly value of 21.5°C in January and a minimum of 2.3°C in July. Average annual precipitation is close to 1,400 mm. There is an annual sum of 2,346 hours of cold and thermal summation base temperature of 5°C of 1.394 day. The frost-free period is between January and February.

The soil is an Andisol, belonging to the series Vilcún, Temuco family, classified as Medial, Music, Entice, Dystrandept. Agriculture has depth of 80 cm and a flat topography with a slope of 0-2%.

Trial establishment and management

Cultivars and experimental lines were sown in previously prepared soil on September 12, using a Planet Junior manual seeder. Seedlings were in rows with a separation of 20 cm each other. The seed dosage was 15 kg ha⁻¹, using rhizobium inoculated seed.

Fertilizers were applied annually according to soil analysis; fertilization at sowing consisted of 140 kg P₂O₅ ha⁻¹, 151 kg K₂O ha⁻¹, 5 kg S ha⁻¹, 1 kg Mg ha⁻¹, 65 kg Na ha⁻¹, 153 kg CaO ha⁻¹; maintenance fertilization the second season was 140 kg P₂O₅ ha⁻¹ and 200 kg K₂O ha⁻¹.

The trial was irrigated five times in the first season (from January to March of 2008) and eight times during the second season (from November of 2008 to March of 2009). More prominent weeds were removed by hand but no herbicide was applied.

Evaluation of *Hylastinus obscurus* (Marsham) in red clover roots

Insect were sampled monthly from November 2007 to May 2009. An average of 12 plants of each cultivar and experimental line were randomly chosen from the three replicates. Plants were extracted with both aerial and radical parts, and they were put into a paper bag and transferred to the Chemical Ecology Laboratory of the Universidad de La Frontera. The radical part was separated from the aerial part and it was carefully cut with a scalpel for evaluating the presence of adult and larvae of *H. obscurus* inside red clover roots because these stages cause weakening and death of red clover plants (Aguilera *et al.*, 1996). These surveys were started when the plants were 4-month-old.

Crown diameter and length of the main root

Crown diameter and length of the main root was evaluated in the same plants used for *H. obscurus* evaluation. Diameter was measured with a Vernier caliper and root length with a metallic rule. Evaluations were performed with the total number of plants collected in the field.

Evaluation of agronomic parameters

Seven cuts were carried out for determining dry matter (DM) yield. Three cuts were performed in the first growing season (2007-2008), and four in the second season (2008-2009). The aged of the plants in the first season were 5 (January 2 2008), 6 (February 20 2008) and 7 (March 31 2008) months, while for the second season the aged of the plants were 14 (October 16 2008), 16 (December 11 2008), 18 (February 9 2009) and 21 (May 5 2009) months.

Because red clover is a perennial, temperate climate species, the beginning of the second growing season cycle was considered as spring 2008. Cuts were made when the clover was found with 5 to 10% of flowering or when it reached an altitude of 40 to 50 cm. Aerial growth was mowed leaving a residue of approximately 5 cm from the soil. A central section of each (1.2 m²) with two quadrants of 0.6 m² each, was used by determining the agronomical parameters: a) plant population was determined as number of plants per m²; b) the foliage cover was evaluated determining the percentage of empty spaces of at least 10 cm between plants found in 1.2 m²; c) dry matter (DM) was evaluated from a subsample of 150 to 200 grams dried in an oven at 65°C for 48 hours, for obtaining the yield in t DM ha⁻¹.

Statistical Analysis

The normality of the data was determined by Shapiro Wilk test. As the number of insects did not correspond to normal data, it was performed the non parametric Friedman test followed of Conover ($P \leq 0.05$) test. Accumulative number of larvae and adult of *H. obscurus* were used for statistical analysis. As agronomical parameters correspond to normal data, ANOVA ($P \leq 0.05$) analysis was carried out and the separation of the groups was determined by LSD ($P \leq 0.05$). Correlation between parameters was tested with Kendall's rank and Spearman's rank tests ($P \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Total dry matter yield of red clover in two seasons is shown in Figure 1. The results showed that there were not significant differences among cultivars and experimental lines in the first season.

However, the experimental lines Syn Int IV, Syn Pre III, Syn Int V and Syn Int VI were more productive than the cultivars Redqueli-INIA and Quiñequeli-INIA at the second season. Ortega *et al.* (2003) reported 17.40 and 15.00 t DM ha⁻¹ for Redqueli-INIA and Quiñequeli-INIA respectively for the total yield of the first two seasons. In this study, both cultivars were roughly less productive, 15.25 and 14.00 t DM ha⁻¹, respectively. However, DM yield from the experimental line Syn Int VI (20.32 t DM ha⁻¹) at second season was comparable to the forage yield of Redqueli (21.10 t DM ha⁻¹) reported by Ortega *et al.* (2003) after three seasons.

There were not significant differences of forage yield among cultivars and experimental lines in the three cuts at the first season (Figure 2), and plants did not show infestation by *H. obscurus* at the first cut performed when plants were 5-month-old. However, the beginning of *H. obscurus* colonization started in all cultivars and experimental lines when plants were six months old. This differs from report of González (1989), indicating that this scolytid does not attack red clover during the first year of establishment. Our results indicated that the insects were found at the end of February, after the fly period and when the insect deposit the eggs in the base of the crown of red clover plants (Matamala, 1976; Aguilera, 1989).

Considering the presence of *H. obscurus*, there were not significant differences among cultivar and experimental lines at the second and third cuts, which could be due to percentage of damaged roots represented on average only the 26% of the roots sampled in each cultivar and experimental line evaluated. Nevertheless, a trend for bearing a higher amount of *H. obscurus* per plant was observed on the Redqueli-INIA cultivar at second and third cuts, with 1.78 and 1.18 insects per plant respectively.

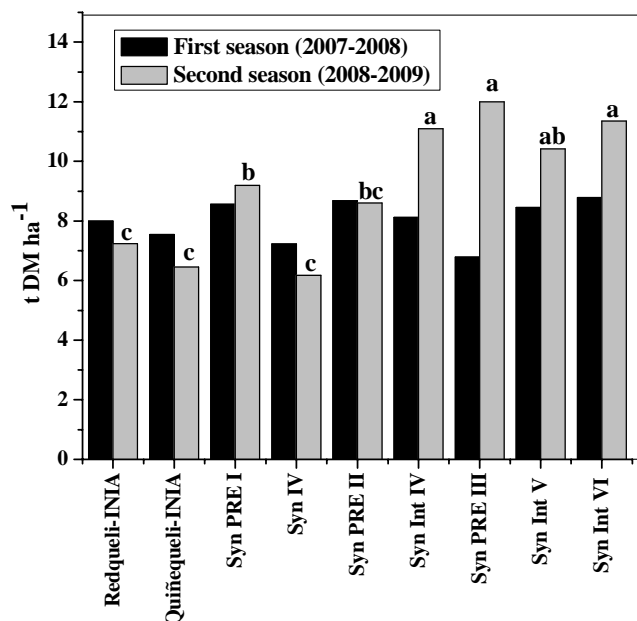


Figure 1. Forage yield (t DM ha⁻¹) of red clover cultivars and experimental lines during two seasons at INIA-Carillanca Experimental Station. Different letters indicates significant differences based on ANOVA analysis and LSD test ($P \leq 0.05$). Absence of letters indicates no significant differences.

During the second season, significant differences were observed on both forage yield and insect population (Figure 3). In the second (December 2008) and third (February 2009) cuts of the second season, Syn Int VI, Syn Int V and Syn Pre III were more productive than the cultivars Requeli-INIA and Quiñequeli-INIA. The low forage yield shown by all the cultivars and experimental lines at the fourth cut, 1.8 t DM ha⁻¹, can be explained because this evaluation was carried out during the autumn (May 2009).

The decrease in dry matter production is common during the winter according to data reported by Demanet (2008), indicating that Quiñequeli-INIA and Redqueli-INIA produce only between 9 to 11% of the total annual production of

dry matter, and the maximum production is obtained during the summer. Significant differences in the population of *H. obscurus* between cultivars and experimental lines were only observed in the second season (Figure 3).

The negative association between *H. obscurus* population and DM yield is shown in Figure 4. The experimental lines Syn Pre III, Syn Int V and Syn Int VI showed significantly higher forage yields and the lowest *H. obscurus* populations. The same effect was observed when the insect population was related to plant density (Figure 5). A correlation analysis of both parameters showed that *H. obscurus* population is negatively associated to plant density (Kendal's rank test, $P \leq 0.05$; Spearman's rank test, $P \leq 0.05$).

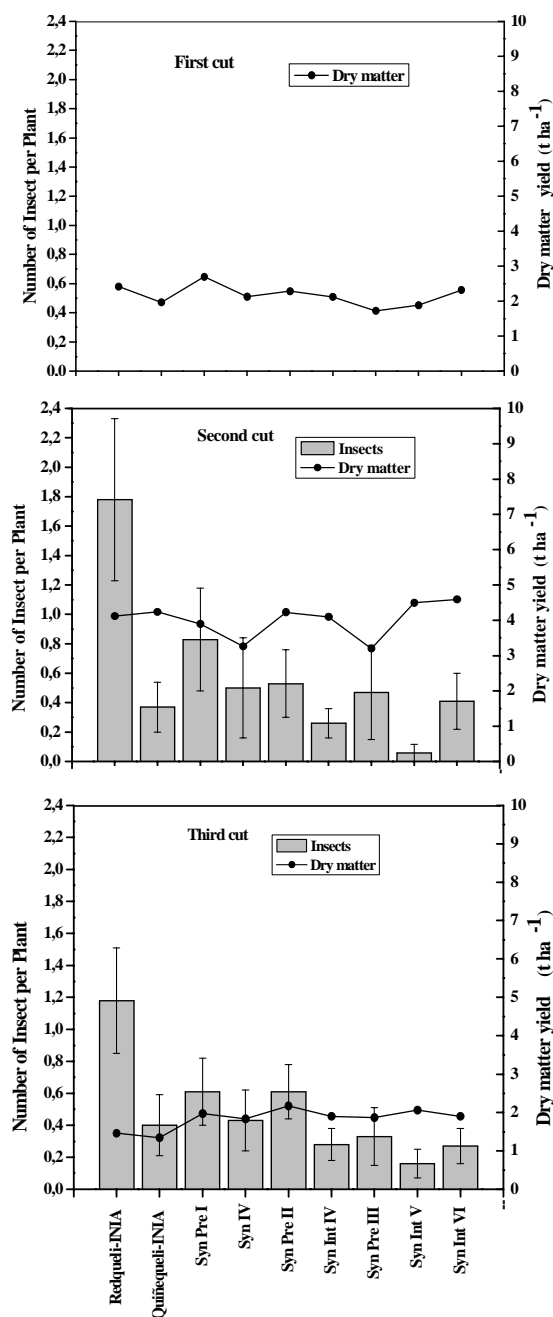


Figure 2. *H. obscurus* population and forage yield of different cultivars and experimental lines of red clover at the first season (2007-2008). Forage yield was analyzed by ANOVA ($P \leq 0.05$) and number of insect were analyzed with Friedman test followed by Conover-Inman test ($P \leq 0.05$). Absence of letters indicates no significant differences.

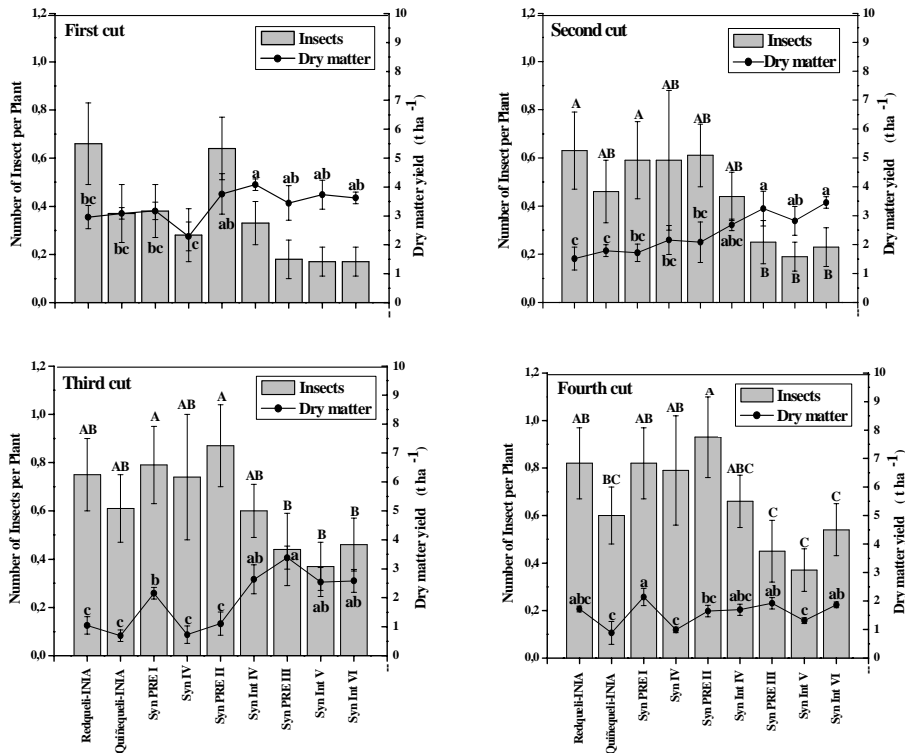


Figure 3. *H. obscurus* population and forage yield of different cultivars and experimental lines of red clover at the second season (2008-2009). Different letters indicate significant differences based on ANOVA ($P \leq 0.05$) for the forage yield. Bars with different letters are significantly based on the non-parametric statistic of Friedman test followed by Conover-Inman test ($P \leq 0.05$).

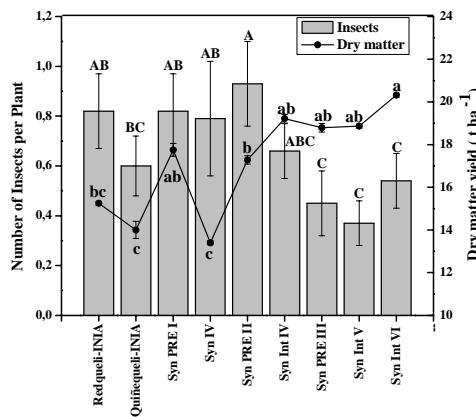


Figure 4. Total forage yield of red clover from two season (2007-2008 and 2008-2009) and number of individuals of *H. obscurus* per plant. Different letters in dry matter indicate significant differences based on ANOVA analysis and LSD test ($P \leq 0.05$). Bars with different letters are significantly based on the non-parametric statistic of Friedman test followed by Conover-Inman test ($P \leq 0.05$).

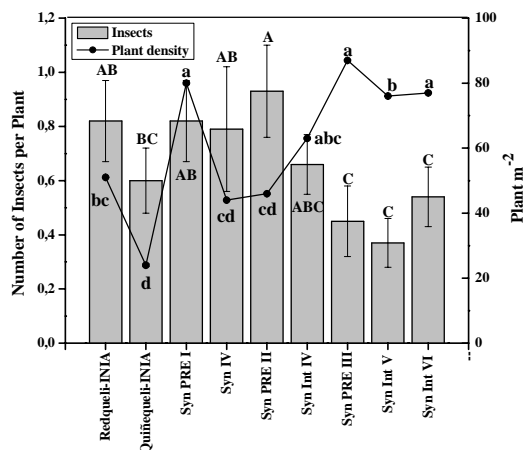


Figure 5. Plant density of cultivars and experimental lines of red clover determined after two seasons of evaluation and *H. obscurus* population. Lines with different letters indicate significant differences based on ANOVA analysis and LSD test ($P \leq 0.05$). Bars with different letters are significantly based on the non-parametric statistic of Friedman test followed by Conover-Inman test ($P \leq 0.05$).

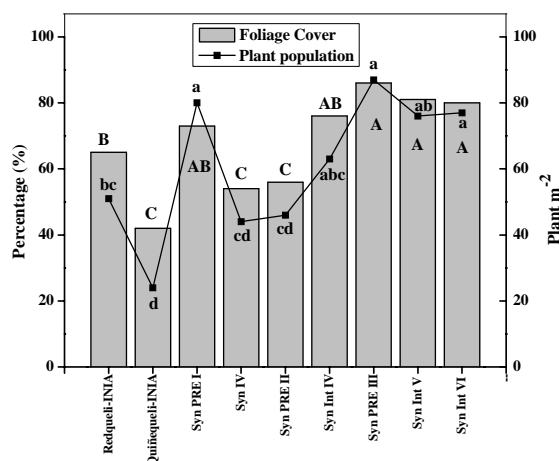


Figure 6. Foliage cover and plant population of cultivars and experimental lines of red clover determined after two seasons of evaluation. Different letters indicate significant differences based on ANOVA analysis and LSD test ($P \leq 0.05$).

Because of this association, these experimental lines could be considered with a higher partial resistance to the root borer attack. On the other hand, Syn Pre I showed forage yield similar to the synthetic lines mentioned above, but with a significantly higher load of insects (Figure 4). Moreover, Syn Pre I showed a

similar plant density, foliage cover and plant population to resistant lines Syn Pre III, Syn Int V and Syn Int VI (Figures 5 and 6). These data suggest that Syn Pre I could be considered as tolerant to *H. obscurus*, according to the definition reported by Rosenthal and Agrawal (1994) and Strauss and Agrawal (1999),

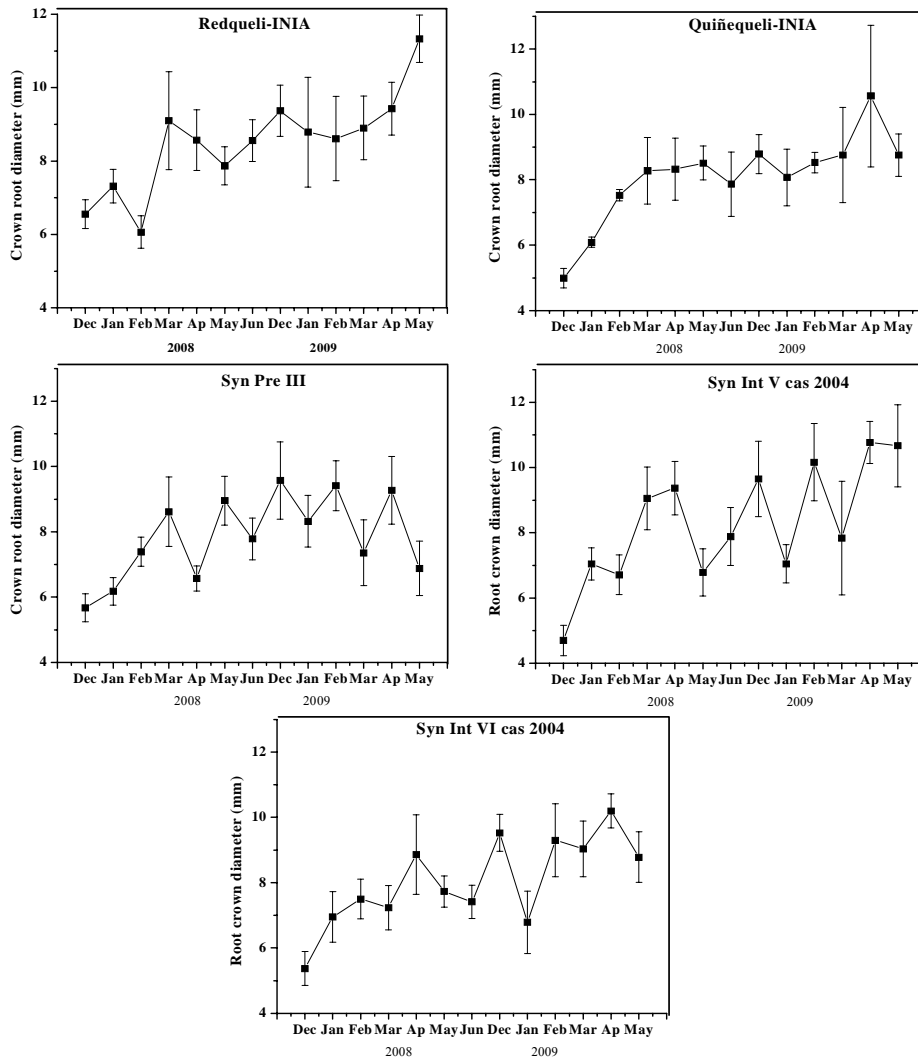


Figure 7. Root crown diameter of cultivars and experimental lines of red clover during two seasons (2007-2008 and 2008-2009). Bars indicate standard error.

and can be evaluated under both artificial and natural environments (Tiffin and Inouye, 2000).

The results shown in Figure 4 allow distinguishing two groups: a) one formed by the partially resistant lines Syn Pre III, Syn Int V and Syn Int VI, and b) Redqueli-INIA and Quiñequeli-INIA and

the rest of experimental lines, including the tolerant line, Syn Pre I. The second group is significantly more attacked by *H. obscurus* than the first group. Redqueli-INIA and Quiñequeli-INIA showed an increase growing pattern of the root crown diameter, in comparison to the resistant lines (Figure 7).

This finding is in accordance to the existence of a positive correlation coefficient between the crown diameter of red clover plants and the number of individuals of *H. obscurus* founded inside the roots (Matamala, 1976).

CONCLUSIONS

Our study reports the first evidence that *H. obscurus* start the colonization of red clover plant of 6-month-old. Moreover, we report a complementary new biological tool for selecting new varieties of red clover, such as the evaluation of *H. obscurus* population. The results showed an inverse relation between forage yield and *H. obscurus* population.

The evaluation of the biological parameter allowed identifying a tolerant line, Syn Pre I, and three potential new varieties: Syn Pre III, Syn Int V and Syn Int VI. These experimental lines showed the lowest population of *H. obscurus* and the highest forage yield of red clover under the experimental conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support for this research was provided by FONDECYT grant 1070270 and INIA grant 500302-70.

REFERENCES

Aguilera, A. 1989. Ficha entomológica de la IX Región de La Araucanía, *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae). IPA-Carillanca 8, 2.

Aguilera, A. 1995. Control selectivo de plagas en frutales de la zona sur. In: A. Aguilera, O. Andrade, J. Díaz, N. Espinoza, R. Galdames, H. Norambuena (eds). Seminario de Protección Vegetal. INIA Carillanca, Temuco, pp: 141-180.

Aguilera, A., Cisternas, E., Gerding, M., Norambuena, H. 1996. Plagas de las praderas. In: I. Ruiz (ed.). Praderas para Chile. Ministerio de Agricultura, Chile, pp: 309-339.

Avendaño, R. 1965. La variedad Quiñequeli y su evaluación con respecto a algunos tréboles rosados corrientes. Agric. Téc. 25,167-171

Becerra, L., Soto, P. 1982. Calendario de utilización de trébol rosado. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Investigación y Progreso Agrícola (IPA), Estación Experimental Quilamapu, Chillán, Chile.

Carrillo, R., Mundaca, N. 1974. Biología de *Hylastinus obscurus* (Marsham) Col., Scolytidae. Agric. Téc. 34, 28-35.

Catrileo, A., Rojas, C. 1987. Ganado y cultivos: posibilidades para enfrentar mejor las variaciones del mercado. IPA Carillanca. 6, 9-11.

Cuevas, E., Balocchi, O. 1983. Producción de forraje. Instituto de Producción Animal. Universidad Austral de Chile. Serie B7, Valdivia, 210 p.

Demagnet, R. 2008. Manual de especies forrajeras y manejo pastoreo. Plan Desarrollo Lechero Watt's. Imprenta Americana, Valdivia. 200 p.

González, R. H. 1989. Insectos y Ácaros de importancia Agrícola y Cuarentenaria en Chile. Editora Ograma S.A. 310 p.

Graham, J., Newton, R. 1959. Relationship between root feeding insects and incidence of crown and root rot in red clover. Plant Dis. Res. 43, 1114-1116.

Koehler, C. S., Gyrisco, G. G., Newsom, L. D., Schwardt, H. H. 1961. Biology and control of the clover root borer, *Hylastinus obscurus* (Marsham). Mem. Cornell Agriculture Experiment Station, New York. 36 p.

Leath, K. 1985. General diseases. In: N.L. Taylor (ed). Clover Science and Technology, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp: 205-233.

Matamala, J. 1976. Biología, niveles de infestación, daño y combate químico de *Hylastinus obscurus* (Marsham). Tesis Agronomía, Universidad Austral de Chile, Chile, 51 p.

- Quiroz, A., F. Ortega, C. Ramírez, L.J. Whadams, K. Pinilla. 2005.** Response of the beetle *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleoptera: Scolytidae) to red clover (*Trifolium pratense* L.) volatiles in a laboratory olfactometer. Environ. Entomol. 34, 690-695.
- Ortega, F. 1996.** Variation in mortality, yield and persistence of red clover (*Trifolium pratense* L.). Ph.D. Thesis, University of Wales, Aberystwyth, United Kingdom, 255 p.
- Ortega, F., Galdames, F., Aguilera A., Romero, O., Ruiz, L., Soto, P., Torres, A. 2003.** Redqueli-INIA, nuevo cultivar sintético de trébol rosado. Agric. Téc. 63, 207-211.
- Ortega, F. 2009.** Fitomejoramiento de trébol Rosado: Variedades para el mercado nacional y de exportación. Tierra Adentro 85, 21.
- Rhodes, I., Ortega, F. 1997.** Plant breeding achievements and prospects, Forage legumes. In: J.R. Weddell (ed.). Seeds of Progress. British Grassland Society, Symposium #31, Nottingham, pp: 15-27.
- Riday, H. 2009.** Correlations between visual biomass scores and forage yield in space planted red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding nurseries. Euphytica 170, 339-345.
- Rosenthal, J.P., Agrawal, P.M. 1994.** Terrestrial plant tolerance to herbivory. Trends Ecol. Evol. 9, 145-148.
- 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.
- Strauss, S.Y., Agrawal, A.A. 1999.** The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. Trends Ecol. Evol. 14, 179-185.
- Tapia, S., Pardo, F., Perich, F., Quiroz, A. 2005.** Clover root borer *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae) has no preference for volatiles from root extract of disease infected red clover. Acta Agri. Scand. Sect. B Soil Plant Sci. 55, 158-160.
- Tapia, T., Perich, F., Pardo, F., Palma, G., Quiroz, A. 2007.** Identification of volatiles from differently aged red clover (*Trifolium pratense*) root extracts and behavioural responses of clover root borer (*Hylastinus obscurus*) (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae) to them. Biochem. Syst. Ecol. 35, 61-67.
- Tiffin, P., Inouye, B.D. 2000.** Measuring tolerance to herbivory: accuracy and precision of estimates made using natural versus imposed damage. Evolution 54, 1024-1029.
- Torres, A., Sierra, C. 1991.** Descripción, adaptación y establecimiento. In: Torres and Dumont (Ed.). Producción y Utilización de Trébol Rosado. Serie Remehue N° 13. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Remehue, Osorno, Chile, pp: 13-25.