

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN
CONTROLADA DE SEMIOQUÍMICOS PARA EL CONTROL DE**
Hylastinus obscurus Marsham

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.

MELISSA HEISE MORA

TEMUCO – CHILE
2012

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN
CONTROLADA DE SEMIOQUÍMICOS PARA EL CONTROL DE**
Hylastinus obscurus Marsham

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.

MELISSA HEISE MORA
PROFESOR GUÍA: ANDRÉS EDUARDO QUIROZ CORTEZ
TEMUCO – CHILE
2012

“IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE SEMIOQUÍMICOS PARA EL CONTROL DE *Hylastinus obscurus* Marsham.”

PROFESOR GUÍA:

ANDRES EDUARDO QUIROZ CORTEZ

Doctor en Química

Departamento de Ciencias Químicas y Recursos
Naturales

Universidad de La Frontera

PROFESOR CONSEJERO:

LEONARDO JAVIER PARRA BARDEHLE

Ingeniero Agrónomo

Doctor en Ciencias de Recursos Naturales

Departamento de Ciencias Químicas y Recursos
Naturales

Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO DE TESIS:

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Hipótesis	3
1.2	Objetivo General	3
1.3	Objetivos específicos	3
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Antecedentes generales de la especie <i>Hylastinus obscurus</i> Marsham	4
2.2	Métodos de control existentes para <i>H. obscurus</i>	5
2.3	Ecología Química y la utilización de compuestos volátiles en el Manejo Integrado de Plagas (MIP)	5
2.3.1	Feromonas	6
2.3.2	Aleloquímicos	6
2.3.3	Kairomonas	7
2.3.4	Alomonas	7
2.4	Métodos de trampeo de insectos plaga	8
2.4.1	Trampas	8
2.4.2	Factores que afectan la eficiencia de un sistema de trampeo	9
2.4.2.1	Factores ambientales	9
2.4.2.2	Factores biológicos	9
2.5	Dispensadores	10
2.5.1	Selección de dispensadores mediante la ecuación de Arrhenius	11
2.6	Ecología Química relacionada con la interacción de <i>H. obscurus</i> - trébol rosado	12
3	MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1	Ubicación del lugar donde se realizó el estudio	14
3.2	Diseño e implementación de un sistema de liberación controlada de semioquímicos (SLC)	14
3.3	Dispensadores	15
3.3.1	Semioquímicos	15
3.3.2	Diseño experimental	16
3.4	Selección del dispensador más eficiente mediante el uso de la ecuación de	17

	Arrhenius	
3.4.1	Determinación de la cantidad residual de semioquímico	17
3.4.2	Determinación de la constante de velocidad para cada temperatura evaluada	18
3.4.3	Determinación de la vida media del dispositivo de liberación	19
3.4.4	Determinación de la energía de activación mediante la ecuación de Arrhenius	20
3.5	Implementación de un experimento de campo	20
3.6	Evaluación de población de <i>Hylastinus obscurus</i> colonizando raíces y en periodo de vuelo	23
4	RESULTADOS Y DISCUSION	25
4.1	Determinación de las curvas de calibración	25
4.2	Determinación de la constante de velocidad para cada temperatura evaluada y para cada dispositivo	26
4.2.1	Limoneno	
4.2.2	<i>E</i> -2-Hexenal	30
4.3	Determinación de la energía de activación mediante la ecuación de Arrhenius	34
4.3.1	Limoneno	34
4.3.2	<i>E</i> -2-Hexenal	36
4.4	Determinación de la vida media del dispositivo de liberación	38
5	CONCLUSIONES	
6	RESUMEN	
7	SUMMARY	
8	LITERATURA CITADA	
9	AGRADECIMIENTOS	
10	ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Hylastinus obscurus</i> Marsham	4
2	Representación de la ecuación de Arrhenius	12
3	Sistema de liberación controlada de semioquímicos	15
4	Dispensadores utilizados en el estudio	15
5	Distribución de los diferentes dispensadores en cámara de cultivo	17
6	Gráfica de la ecuación de la recta	19
7	Distribución de los semioquímicos sobre parcelas de trébol rosado	21
8	Experimento de campo	22
9	Trampa adhesiva utilizada para el monitoreo de <i>H. obscurus</i>	24
10	Curva de calibración para limoneno y <i>E</i> -2hexenal	25
11	Curvas para obtener la constante de velocidad (k) limoneno D1	27
12	Curvas para obtener la constante de velocidad (k) limoneno D2	28
13	Curvas para obtener la constante de velocidad (k) limoneno D3	29
14	Curvas para obtener la constante de velocidad (k) <i>E</i> -2hexenal D1	31
15	Curvas para obtener la constante de velocidad (k) <i>E</i> -2hexenal D2	32
16	Curvas para obtener la constante de velocidad (k) <i>E</i> -2hexenal D3	33
17	Resultado de las energías de activación de limoneno	35
18	Resultado de las energías de activación de <i>E</i> -2hexenal	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Temperatura y número de dispensadores utilizados para cada compuesto	16
2	Constantes de velocidad a diferentes temperaturas para limoneno	30
3	Constantes de velocidad a diferentes temperaturas para <i>E</i> -2-hexenal	34
4	Constantes de velocidad de limoneno transformadas a su forma logarítmica	34
5	Constantes de velocidad de <i>E</i> -2hexenal transformadas a su forma logarítmica	36
6	Vida media de limoneno en dispensador 2	38
7	Vida media de <i>E</i> -2-hexenal en dispensador 2	38
8	Parámetros evaluados en parcelas tratadas con limoneno	39
9	Parámetros evaluados en parcelas tratadas con <i>E</i> -2hexenal	40
10	Monitoreo de <i>H. obscurus</i> en trampa pegajosa	41

1. INTRODUCCIÓN

Hylastinus obscurus Marsham, es una especie perteneciente a la familia Scolytidae. Este insecto también llamado barrenador de la raíz, vive y se alimenta en las raíces de plantas de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.), forrajera de gran importancia en la zona centro-sur de Chile. La infestación que provoca este insecto afecta el rendimiento de la materia seca y disminuye la persistencia de la pradera.

Dentro de los métodos de control que se han utilizado para disminuir o erradicar definitivamente la población de *H. obscurus*, se encuentra el control químico, que ha sido ineficaz debido a la ubicación del insecto en el interior de las raíces y su largo periodo de vuelo. Actualmente no existe un control eficaz para la eliminación de este insecto.

Por lo anterior, la búsqueda de nuevos métodos de control alternativos tal como el basado en la etología del insecto plaga son necesarios. La Etología es el estudio del comportamiento de los animales en relación con el medio ambiente. Específicamente se refiere al uso de sustancias semioquímicas, tales como feromonas, atrayentes, repelentes u otras formas de control que modifican el comportamiento de las plagas ya sea atrayéndolas o repeliéndolas. Dentro de las principales ventajas de este control se encuentra su contribución al desarrollo de una agricultura acorde con buenas prácticas agrícolas, que se traducen en el uso responsable de los recursos naturales (suelo, cursos de agua y otros), de manera de formar un sistema agrícola sustentable, sostenible en el tiempo.

En relación a este tema, en el Laboratorio de Ecología Química de la Universidad de La Frontera se han desarrollado diversos trabajos de investigación, donde se han identificado, entre otros, compuestos que actúan como atrayente (*E*-2-hexenal) y repelente (limoneno), de este insecto bajo condiciones de laboratorio. Ambos compuestos podrían ser utilizados en el control etológico de *H. obscurus* en condiciones de campo.

Una siguiente etapa investigativa corresponde a la implementación de estos compuestos a nivel de campo. Para ello, es necesario desarrollar un sistema de aplicación de estos compuestos para ser utilizados en el control de *H. obscurus*.

La aplicación de estos compuestos químicos, se lleva a cabo mediante dispensadores, que se utilizan como “contenedores” de semioquímicos, y que permiten su liberación al ambiente en un tiempo determinado. Estos dispensadores son fabricados de diversos materiales tales como goma, celulosa, polietileno y otros. Actualmente, existen diversas investigaciones sobre el tema del uso de los dispensadores en Chile pero con especies y hospederos distintos al utilizado en este estudio.

Por lo tanto, para implementar el método de control etológico sobre *H. obscurus*, se requieren estudios que proporcionen una comprensión más acabada del uso de semioquímicos en condiciones de campo, específicamente en lo relacionado a la selección de un dispositivo adecuado y a su efectividad bajo condiciones de campo.

1.1 Hipótesis

“La aplicación de un sistema de liberación controlada de semioquímicos bajo condiciones de campo, permitirá atraer y repeler *Hylastinus obscurus*”

1.2 Objetivo General:

Evaluar el efecto de *E*-2-hexenal y limoneno sobre la población de *Hylastinus obscurus*, bajo condiciones de campo.

1.3 Objetivos Específicos:

1. Diseñar un sistema de liberación controlada de semioquímicos con tres tipos de dispensadores a seis diferentes temperaturas.
2. Evaluar el efecto de la temperatura sobre la tasa de liberación de cada semioquímico en los diferentes dispensadores.
3. Determinar cual dispensador es más eficiente para ser utilizado en el control etológico de *H. obscurus*.
4. Evaluar el efecto de *E*-2-hexenal y limoneno dispuesto en el mejor dispensador sobre la población de *H. obscurus*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes generales de *Hylastinus obscurus* Marsham.

Hylastinus obscurus es un insecto considerado plaga en trébol rosado, una importante especie forrajera cultivada en el sur de Chile, cuyo ataque reduce su persistencia y productividad (Cisternas & Norambuena, 1991).

H. obscurus, también llamado barrenador de la raíz del trébol, es un coleóptero que se distribuye en Europa, Estados Unidos, Canadá y África del Norte (Aguilera, 1989; Matamala, 1976) y cuya presencia en nuestro país fue detectada en 1971 en la Región de La Araucanía (Matamala, 1976).

Diversos autores tales como Koehler *et al.* (1961) afirman que el daño es producido por los estados de larva y adulto, los cuales se alimentan de tejidos radicales, corteza y a veces del cilindro vascular, lo que provoca: 1) distorsiones en el almacenamiento de carbohidratos (Cisternas & Norambuena, 1991), y 2) un quiebre en el sistema de transporte de nutrientes y agua desde el suelo, lo que facilita la entrada de agentes patógenos a la raíz y corona de la planta (Pruess & Weaver, 1958).



Figura 1. *Hylastinus obscurus* Marsham (Fuente: Laboratorio Ecología Química, UFRO, 2010).

2.2 Métodos de control existentes para *H. obscurus*.

Actualmente los métodos de control existentes no han sido exitosos debido a múltiples razones, tales como: 1) largo periodo de vuelo del insecto, 2) ubicación en el interior de las raíces de trébol y 3) elevado costo de insecticidas y daños que puedan ocasionar al medio ambiente. Por consiguiente, el control químico (uso de productos fitosanitarios) y biológico (uso de un depredador y/o controlador) no han resultado ser efectivos (Dariane & Morrison, 1957). El control natural ejercido por algunos insectos, aves y hongos no juega un rol significativo en el control de *H. obscurus* (Dariane & Morrison, 1957). El control cultural, referido a la rotación de la pradera tampoco es una alternativa de control para este escolítido (Aguilera *et al.*, 1996), debido principalmente al objetivo de la pradera; el cual corresponde a la persistencia del cultivo.

2.3 Ecología Química y la utilización de compuestos volátiles en el Manejo Integrado de Plagas (MIP).

La ecología química es un campo de investigación multidisciplinaria que estudia la estructura, función y biosíntesis de compuestos químicos que tienen efecto sobre diversos organismos, ya sea de atracción o repelencia; su importancia en los diferentes niveles de la organización ecológica, su origen evolutivo y su aplicación a las necesidades sociales (Metclaf & Metcalf, 1992a). Los compuestos que mediatizan las interacciones químicas entre los organismos y su ambiente son conocidos como semioquímicos (del griego *semeon*: señal) (Law & Regnier, 1971). Los semioquímicos son divididos de acuerdo al tipo de interacción en que participan. En primer lugar se encuentran las feromonas (del griego *pherein*; llevar o transferir, *horman*; excitar o estimular) que median las relaciones intraespecíficas. En segundo lugar están los aleloquímicos, que median las interacciones interespecíficas (Barrera *et al.*, 2006).

La característica más importante de las sustancias semioquímicas para el MIP, es su especificidad, ya que son muy útiles para monitorear plagas cuando estas son bioactivas. Aunque estas sustancias semioquímicas no son biocidas, su capacidad de control es evidente por su condición de generar cambios en el comportamiento de los insectos tales como, agregación, disrupción de la copula, o para atraerlos y disminuir su población debido a la asociación de kairomonas con pesticidas químicos (Rodríguez & Niemeyer, 2005).

2.3.1 Feromonas En general, las feromonas sexuales de insectos son sustancias activas, altamente específicas si se considera que producen una respuesta en el comportamiento de individuos de una misma especie. Además su utilización no presenta efectos adversos contra insectos benéficos y no han sido relacionadas con la aparición de resistencia en insectos (Haynes & Baker, 1988).

Las feromonas sexuales presentan varias aplicaciones en programas de MIP, se ha reportado su utilización en la detección de poblaciones de insectos mediante el uso de trampas, su combinación con esterilizantes o insecticidas y su empleo para producir la confusión sexual en machos y la disminución de la cópula (Pedigo, 1996). Esta última aplicación es conocida como la técnica de interrupción de la cópula, la cual consiste en introducir en el ambiente múltiples fuentes emisoras de una feromona en altas concentraciones, que puede ser liberada mediante el empleo de dispensadores colocados en campo o a través de la aplicación de una feromona por aspersión, esto con el propósito de saturar el ambiente y mantener constante una alta concentración de feromona en el campo. De esta manera, se genera confusión sexual en los machos objetivos, enmascarándose la feromona real liberada por las hembras en el área tratada, con la consecuente interrupción de la cópula y la disminución gradual de las poblaciones posteriores (Ogawa, 1997). Sin embargo, factores intrínsecos como extrínsecos influyen en la eficiencia de las feromonas para ser utilizadas en la detección y captura de insectos. Dentro de los primeros se encuentran los componentes de la feromona y el número de ellos, pureza y tasa de liberación. En el segundo grupo se encuentran: diseño de la trampa, sustrato de liberación (dispensadores), altura y localización de las trampas; además de algunos factores ambientales, como temperatura y humedad (American Chemical Society, 1976; Minks, 1997).

2.3.2 Aleloquímicos. Durante la búsqueda de sitios de alimentación, de una potencial pareja y/o sitios de oviposición, los insectos usan compuestos volátiles emitidos por sus plantas hospederas. Generalmente, se asume que insectos monófagos y oligófagos utilizan compuestos “típicos” de sus plantas hospederas, mientras que insectos polífagos usan compuestos “generales” que se encuentran en una gran diversidad de plantas (Stadler, 2002).

Los aleloquímicos se dividen en: 1) alomonas (el organismo emisor se beneficia y el receptor se perjudica), 2) kairomonas (el organismo receptor se beneficia y el emisor se perjudica), y 3) sinomonas (ambos organismos, emisor y receptor, son beneficiados). De este grupo los que han sido utilizados en el desarrollo de atrayentes para el trampeo de insectos plaga son las kairomonas (Metclaf & Metclaf, 1992b). Por otra parte, Mareggiani (2001) afirma que las sustancias aleloquímicas, emitidas por plantas, que tienen mayor importancia en la selección del alimento por parte de una plaga, son las kairomonas y alomonas.

2.3.3 Kairomonas. Schoonhoven *et al.* (1998), indican que las kairomonas o atrayentes son aquellos compuestos volátiles que provocan que un insecto dirija sus movimientos hacia la fuente de emisión. Las kairomonas volátiles pueden utilizarse en el MIP como atrayentes de alimentación o de oviposición de parasitoides, tanto para monitorear sus poblaciones como para atraerlos hacia aquellos sitios donde su presencia favorezca el control de una plaga (Hall & Menn, 1999). Por ejemplo, algunos sistemas de monitoreo de coleópteros plagas de granos también utilizan kairomonas como cebos atrayentes (Obeng-Ofori, 1993). La emisión de kairomonas por la planta favorece al insecto porque lo orienta hacia ella, o induce su alimento u oviposición, entre otros beneficios (Mareggiani, 2001). Otra aplicación importante de los atrayentes es mediante su incorporación en formulaciones con bacterias y virus entomopatógenos que no actúan por contacto, de manera que la presencia del estimulante, en este caso alimentario, favorezca la ingestión del plaguicida biológico y su efecto posterior (Avé, 1995).

2.3.4 Alomonas. Según lo reportado por Mareggiani (2001) y Bernays (2000); cuando el aleloquímico emitido es una alomona, resulta favorecida la planta porque disminuye la posibilidad de que un herbívoro generalista o polífago pueda utilizar esa planta como fuente de alimento, ya que lo repele, disuade la alimentación o la oviposición, e interrumpe su desarrollo, entre otros efectos, por el cual las alomonas actúan como defensas químicas naturales contra los fitófagos.

También son útiles en el MIP, debido a sus diferentes modos de acción: repelente, fagodisuasivo, disuasivo de oviposición y regulador de crecimiento, entre otros (Warthen & Morgan, 1990). Por ejemplo, Frazier & Chyb (1995), mencionan que muchos de los repelentes identificados corresponden a cumarinas, aldehídos, cetonas y alcoholes, siendo su efectividad óptima, no obstante, presentan como gran limitante la volatilidad (Bowers, 1993). Sin embargo, esta dificultad se podría solucionar a través de estudios de cinética de liberación o liberación controlada, lo cual podría aumentar la persistencia de estos compuestos en el ambiente (Hall & Menn, 1999).

2.4 Métodos de trampeo de insectos plaga.

2.4.1 Trampas. Si bien las kairomonas y otros tipos de aleloquímicos han sido utilizados en la captura de insectos tales como, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Curculionidae) y *Acalymma vittatum* (F.) (Chrysomelidae) (Brust & Foster, 1995), uno de los factores que más influyen en la eficiencia de captura, es el tipo de trampa utilizada, lo cual resulta fundamental para el éxito o fracaso del control etológico (Parra, 2009).

Una trampa se puede definir como una estructura física que posee características que le permiten atraer y capturar algún organismo en particular (Flores, 2003). En el caso de los insectos existen formas muy variadas en el diseño de las trampas, el cual depende del tipo de insecto que se desea capturar así como de los objetivos para los que se establece el sistema de trampeo (detección, monitoreo, control, entre otros). De acuerdo a Muirhead-Thomson (1991), entre los tipos de trampas más utilizados se encuentran: 1) trampas de luz, dirigidas a especies voladoras de hábitos nocturnos; 2) trampas de succión (aspiradores bucales) dirigidas a especies voladoras de tamaño pequeño (mosquitos y áfidos); y 3) trampas cebadas con atrayentes sexuales, principalmente feromonas. El diseño del cuerpo de una trampa debe combinar ciertas características esenciales tales como: 1) un dispositivo donde colocar al atrayente, el cual debe protegerlo de las condiciones medioambientales pero al mismo tiempo permitir su liberación efectiva y controlada, y 2) tener una estructura propia (cuerpo) de la trampa, que debe dar forma y soporte a los componentes anteriormente mencionados (Barrera *et al.*, 2006). Además los mismos autores mencionan que la eficiencia de cualquier sistema de trampeo también está influenciada por la naturaleza del dispensador o liberador en el cual va contenido el atrayente, ya que juega un papel muy importante en la tasa de liberación y el

tiempo que éste puede durar activo en el campo. Por lo tanto, la tasa de liberación del atrayente dependerá de: 1) propiedades químicas del compuesto, 2) propiedades físicas, 3) químicas de la matriz del liberador, y 4) condiciones ambientales tales como la temperatura y velocidad del viento.

La eficiencia de un sistema de trapeo depende en gran medida del conocimiento y aplicación adecuada de los principios de ecología química. Cuando se trata de detectar, monitorear y/o controlar alguna especie de insecto de importancia económica, de manera “ideal” se esperaría contar con un sistema de trapeo que fuera específico, eficiente, económico, fácil de establecer y manejar en el campo, con atrayentes que tengan larga durabilidad y estabilidad bajo condiciones naturales (Barrera *et al.*, 2006).

2.4.2 Factores que la afectan la eficiencia de un sistema de trapeo. Los puntos anteriormente descritos pueden definir por si mismos algunas de las principales limitaciones que presentan los sistemas de trapeo en cuanto a su utilización en condiciones de campo. Estas limitaciones pueden estar representadas por un factor individual, por la combinación de más de un factor tales como diseño de la trampa + atrayente o por la interacción de factores inherentes al sistema de trapeo, entre las que se encuentran las condiciones medioambientales y la biología del insecto (Barrera *et al.*, 2006). Por otra parte, Ridgway *et al.* (1990) afirman, en el caso de las feromonas, que la eficacia de la confusión sexual en el control de plagas ha sido ampliamente demostrada, sin embargo, la fabricación de dispositivos que liberen la cantidad necesaria y la calidad de la feromona en la estación de crecimiento ha sido una de las principales limitantes.

2.4.2.1 Factores ambientales. Los factores ambientales también pueden repercutir en la eficiencia de los sistemas de trapeo. La temperatura incide de manera directa en la actividad de los insectos y en la tasa de liberación de los atrayentes. Las bajas temperatura pueden ocasionar una tasa de liberación menor, lo cual limitaría el radio de acción del atrayente. Una temperatura muy elevada podría ejercer una acción contraria, ocasionando un agotamiento más temprano de la fuente del atrayente, limitando de esta manera su periodo de acción. De acuerdo con Montoya *et al.* (2002), las lluvias pueden influir negativamente en la tasa de captura por trampa, probablemente debido a la menor movilidad que los insectos presentan bajo estas condiciones.

2.4.2.2. Factores biológicos. Las trampas deben ser colocadas sobre plantas hospederas cuya fenología presente el estado en que es atacado de manera preferencial por la plaga. La altura y el lugar de colocación de la trampa en el hospedero también juegan un papel importante. Por ejemplo, en el caso de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) se recomienda que las trampas que utilicen atrayentes sexuales se coloquen en la parte media de la copa de los árboles y en áreas semisombreadas (Barrera *et al.*, 2006), ya que son los sitios donde las moscas normalmente se aparean. En cultivos como algodónero, atacado por el gusano rosado *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae), las trampas se colocan generalmente en una estaca a la altura promedio que presenten las plantas (Mitchel, 1981), porque es a esa altura donde el insecto vuela en su estado adulto y se mantiene activo. A pesar que muchos insectos son buenos voladores, algunos pueden entrar caminando a las trampas, por lo cual también se sugiere poner las trampas al ras del suelo como es el caso de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) (Oehlschaler *et al.*, 1993).

2.5. Dispensadores

Algunos ejemplos de dispensadores/liberadores utilizados en el control o monitoreo de insectos, lo constituyen diferentes dispositivos a base de polímeros (pastillas, láminas), membranas, septas de hule, piezas de plástico, y otros (Baker *et al.*, 1997). Lo ideal es que estos materiales liberen el atrayente homogéneamente a través del tiempo. Incluso actualmente, se habla de liberadores “inteligentes” que permitirían liberar el atrayente solamente en el periodo cuando los insectos están activos, trayendo en consecuencia un ahorro del compuesto químico utilizado (Mafra-Neto & Baker, 1996). Por otra parte, Zhang (2005) indica que desde el punto de vista de manejo de plagas de insectos, es conveniente disponer de un dispositivo que pudiese liberar los semioquímicos a un ritmo constante. En la actualidad, desde una perspectiva económica y por la forma de liberar el compuesto al ambiente, los dispositivos más populares para la aplicación de semioquímicos siguen siendo los clásicos dispositivos de liberación controlada, tales como plástico, caucho, laminados, microcápsulas, cuerdas, entre otros. Investigaciones realizadas para evaluar la efectividad de un dispensador sugieren: examinar el contenido residual (pérdida de peso o el análisis de extracción con disolvente) de las muestras expuestas en el laboratorio o campo que es, entre otros, el método mas utilizado para obtener la tasa de emisión. Sin embargo, la desventaja de este método clásico es que se requiere mucho tiempo de investigación (meses o años) para obtener resultados (Warthen *et al.*, 1998a, Warthen *et al.*, 1998b). Finalmente, la tasa de

liberación de un ingrediente activo es un factor crítico que puede afectar la eficacia de los dispensadores de semioquímicos en el manejo de plagas.

2.5.1 Selección de dispensadores mediante la ecuación de Arrhenius. Para determinar la liberación de un compuesto químico desde un emisor, en este caso los dispensadores, se debe recurrir a la cinética química. Ésta área de la fisicoquímica se relaciona con la capacidad de medir la velocidad de una reacción; de cómo se libera un compuesto o como reacciona dependiendo de factores tales como temperatura, presencia de catalizadores y concentración, entre otros.

Asimismo, las reacciones se pueden clasificar como de primer, segundo y tercer orden. El orden de la reacción lo define el exponente de una ecuación dada, como resultado de la misma. Para cuantificar la liberación de los compuestos desde los tres dispensadores estudiados, se utilizó la ecuación de Arrhenius, cuya fórmula se define como:

$$k(T) = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

donde:

$k(T)$: constante cinética (dependiente de la temperatura)

A : factor pre-exponencial o factor de frecuencia. Refleja la frecuencia de las colisiones.

E_a : energía de activación, expresada en J/mol.

R : constante universal de los gases. Su valor es $8,3143 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

T : temperatura absoluta [K]

La ecuación de Arrhenius se utiliza para comprobar la velocidad de una reacción química dependiente de una constante cinética (velocidad) a través del tiempo, la cual requiere de una energía mínima de activación. Esta ecuación permite calcular las constantes de velocidad para cada temperatura mencionadas anteriormente, y con ello conocer la cinética de liberación de compuestos con diferentes efectos sobre *H.obscurus* tales como *E-2-hexenal* y *limoneno* (capítulo 2.6) desde los dispositivos escogidos para esta investigación. Para graficar los resultados se utilizó el gráfico de Arrhenius, el cual se expresa como:

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right)$$

Esta fórmula permite graficar a través de coordenadas cartesianas el logaritmo de las constantes de velocidad de los semioquímicos en relación al tiempo⁻¹. La expresión gráfica se representa como una línea recta con pendiente negativa, lo cual se observa en la figura 2.

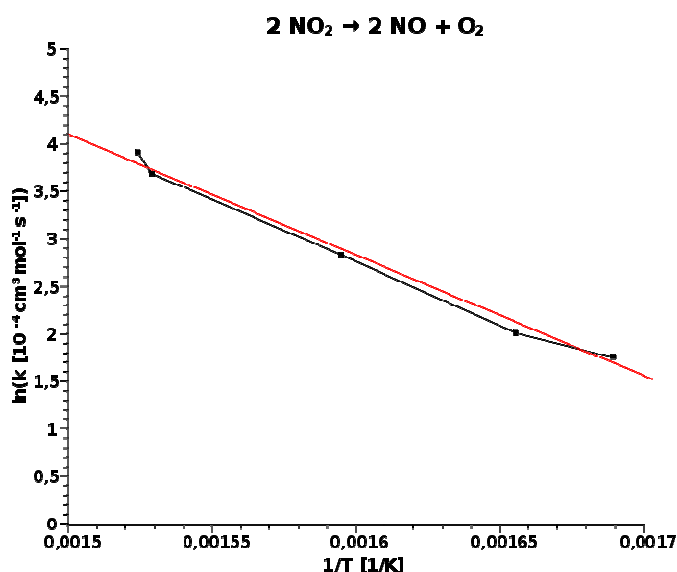


Figura 2. Representación de la ecuación de Arrhenius.

Los resultados graficados acorde a la ecuación de Arrhenius permitirán conocer y escoger el mejor dispensador para ser utilizado, por ejemplo, en un experimento de campo.

2.6. Antecedentes químicos-ecológicos sobre la interacción de *H. obscurus* – trébol rosado.

El grupo de Ecología Química, perteneciente al Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales de la Universidad de La Frontera, a cargo de profesor Dr. Andrés Quiroz, ha desarrollado desde hace varios años diversas investigaciones relacionadas con la interacción *H. obscurus* – trébol rosado, a través de proyectos FONDECYT, los cuales han reportando importantes antecedentes sobre esta relación huésped-hospedero, como son: identificación de volátiles obtenidos desde extracto de raíces, determinación de la aceptación de hospedero por parte del insecto en cuanto a la edad del cultivar de trébol rosado, entre otros.

En estudios realizados por este grupo de investigación, se han identificado dos compuestos relevantes en cuanto a la selección y conducta del hospedero por parte de *H. obscurus*.

Quiroz *et al.* (2005), reportaron una respuesta olfatométrica de atracción por parte de *H. obscurus* hacia volátiles de trébol rosado liberados desde plantas de 1,5 a 2,5 años de edad.

Según lo reportado por Tapia *et al.* (2007), desde los extractos de raíz, se identificaron benzoato de metilo y *E*-2-hexenal responsables de la atracción de *H. obscurus* y limoneno, que actuó como repelente. La cuantificación de los compuestos activos desde raíces de trébol rosado reveló una reducción significativa de la concentración *E*-2-hexenal a partir de 2,12 a 0,76 µl/ml y un aumento en la concentración de limoneno de 0,26 a 0,68 µl/ml en plantas de 1,5 años, frente a plantas de 2,5 años de edad, respectivamente. Este resultado explica la falta de respuesta del barrenador hacia plantas de mayor edad.

Por otra parte, Alarcón *et al.* (2010) demostraron en estudios con cultivares y líneas experimentales de trébol rosado, que la infestación por parte este escolítido se inicia a los seis meses de edad de las plantas. La evaluación de los parámetros biológicos permitió finalmente discernir una línea tolerante Syn Pre I y tres potenciales nuevas variedades; Syn Pre III, Syn Int V, y Syn Int VI.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del lugar donde se realizó el estudio.

Los ensayos se efectuaron en el Laboratorio de Ecología Química (L.E.Q) del Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, perteneciente a la Universidad de La Frontera, Región de La Araucanía. El periodo de evaluación estuvo comprendido entre Enero y Diciembre de 2011.

3.2. Diseño e implementación de un sistema de liberación controlada de semioquímicos.

Para el estudio, se diseñó e implementó un sistema de liberación controlada para los compuestos limoneno y *E*-2-hexenal. Para ello se utilizó una cámara de cultivo marca Selecta, modelo Hot-Cold GL, con programador de temperatura e intercambiador de calor, cuyo volumen es de 0,41 m³. Además se diseñó un sistema de ventilación para la cámara con una entrada (ventilador) y salida (manga de aluminio) para obtener un flujo de aire constante en su interior y permitir con ello simular las condiciones de campo (Fig. 3).

Para poder determinar una relación entre la velocidad del viento real y el flujo de aire al interior de la cámara, se hicieron mediciones en terreno sobre parcelas de trébol rosado establecidas en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA Carillanca de las cuales se obtuvo un promedio de 6,9 m/s entre el periodo septiembre-noviembre de 2010. Asimismo, se midió la velocidad de flujo de la cámara, que a la entrada del ventilador fue de 5,8 m/s y a la salida de la manga de aluminio 4,9 m/s.



Figura 3. Sistema de liberación controlada de semioquímicos: A) Cámara de cultivo, B) Tubo de ventilación conectado hacia una campana de extracción, y C) Ventilador.

3.2.1. Dispensadores. Se utilizaron tres tipos de dispensadores: Dispensador 1 (esponja de celulosa de 2 x 2cm, marca 3M), Dispensador 2 (septa de goma roja= Rubber Septum, Sigma Aldrich, Stenheim, Alemania) y Dispensador 3 (esponja de celulosa marca 3M, de 2 x 2cm, inserta en bolsa de polietileno) (Fig. 4). Previo a su utilización, los dispensadores fueron sometidos a un lavado con solvente (diclorometano) por 24 h, y luego secados bajo campana por 48 h.

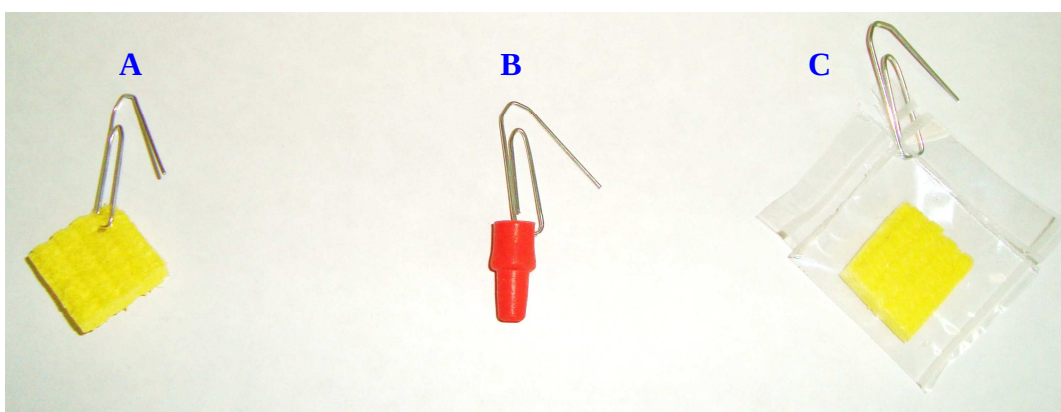


Figura 4. Dispensadores utilizados en el estudio: A) Dispensador 1, B) Dispensador 2, y C) Dispensador 3.

3.2.2 Semioquímicos. Los compuestos probados en los diferentes dispensadores correspondieron a limoneno (repelente) y *E*-2-hexenal (atrayente). El volumen aplicado de cada compuesto por dispensador fue de 50 μ L. Estos compuestos fueron utilizados en este

estudio, previas investigaciones en las cuales fueron identificados como repelente y atrayente, respectivamente (Tapia *et al.*, 2007).

3.2.3 Diseño Experimental. Los ensayos realizados bajo condiciones de laboratorio, se establecieron con un diseño experimental de bloques no aleatorizados para cada compuesto. Se efectuaron seis tratamientos (temperaturas), con tres repeticiones cada uno durante siete días. El detalle de cada tratamiento se muestra en Tabla 1.

Tabla 1. Temperatura y número de dispensadores utilizados para cada compuesto.

Limoneno				E-2-hexenal			
Temperatura °C	Dispensador1	Dispensador2	Dispensador3	Temperatura °C	Dispensador 1	Dispensador 2	Dispensador 3
10	21	21	21	10	21	21	21
15	21	21	21	15	21	21	21
20	21	21	21	20	21	21	21
25	21	21	21	25	21	21	21
30	21	21	21	30	21	21	21
35	21	21	21	35	21	21	21
Dispensadores	126	126	126	Dispensadores	126	126	126
Limoneno	378			E-2-hexenal	378		
Total dispensadores	756						

Semanalmente se introdujeron 21 muestras por dispensador a la cámara de cultivo a una temperatura determinada (Fig. 5). Posteriormente, cada 24 h se extrajeron tres muestras por dispensador, lo cual fue repetido durante una semana. Las temperaturas utilizadas se encuentran en un rango promedio que ocurre en la zona centro-sur del país, durante la temporada primavera-verano.



Figura 5. Distribución de los diferentes dispensadores en cámara de cultivo.

3.3 Selección del dispensador más eficiente mediante el uso de la ecuación de Arrhenius

3.3.1 Determinación de la cantidad residual de semioquímico. La cantidad residual de semioquímico en el dispositivo de liberación controlada será el parámetro experimental a introducir en las ecuaciones cinéticas que permitirán seleccionar el dispositivo más eficiente. Para ello, diariamente se sacaban 3 dispositivos de cada tipo desde la cámara y se depositaban en 3 viales de 20 ml, a los cuales se adicionaba 5 ml de hexano, permaneciendo en este estado por 7 días, para luego ser almacenadas a -2°C . Luego de una semana, las muestras fueron agitadas por un minuto en un vórtex para luego ser concentradas con corriente de nitrógeno a $100\text{ }\mu\text{l}$. Para determinar la concentración, $1\text{ }\mu\text{l}$ de cada muestra fue inyectado en un cromatógrafo de gases (Focus GC; Thermo Electron Corporation) acoplado a un espectrómetro de masas (DSQ; Thermo Electron Corporation), provisto de una columna apolar HP-1 Ultra ($25\text{m} \times 0,2\text{ mm} \times 0,33\text{ }\mu\text{m}$). El cromatógrafo de gases fue programado con una gradiente de temperatura que se iniciaba en 40°C por 1 minuto, para luego subir hasta 250°C a una razón de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La temperatura del inyector fue fijada en 250°C y el flujo de Helio fue de $1,5\text{ ml}/\text{min}$. La energía de ionización en el espectrómetro de masas se fijó a 70 eV , la temperatura de la interface entre el cromatógrafo y el espectrómetro de masas la de la fuente iónica fueron fijadas en 200°C . La determinación de la concentración de semioquímico fue realizada mediante la elaboración de curvas de calibración.

3.3.2 Determinación de la constante de velocidad para cada temperatura evaluada. La velocidad de una reacción química de cinética de primer orden se expresó mediante la siguiente ecuación:

$$\boxed{\frac{-dc}{dt} = kC} \quad \boxed{\text{Ecuación 1}}$$

Donde:

k es la constante de velocidad del proceso

C es la concentración del compuesto

t es el tiempo

El signo negativo indica que el compuesto desaparece, es decir, la concentración va disminuyendo en el tiempo en el dispensador a medida que se incrementa la temperatura a través del tiempo (Ecuación 1). Posteriormente, esta ecuación se debe reordenar para poder integrarla y despejar la constante de velocidad que es necesaria para poder predecir la velocidad de la reacción así como el dispensador más eficiente para ser usado en el experimento de campo. Reordenando la ecuación 1 se obtiene:

$$\boxed{\frac{-dc}{C} = kdt} \quad \boxed{\text{Ecuación 2}}$$

Integrando la ecuación 2, se obtiene

$$-\int_{C_0}^C \frac{dc}{C} = \int kdt$$

$$\boxed{\ln (C/C_0) = -kt} \quad \boxed{\text{Ecuación 3}}$$

Esta ecuación permitirá calcular la constante de velocidad asociada a cada temperatura para *E*-2-hexenal y limoneno y corresponde a una ecuación de la línea recta ($y= mx+b$) siendo b en este caso igual a cero. Por lo tanto:

$y = \ln \frac{C}{C_0}$ y $mx = -kt$, siendo k la pendiente de la recta (m) y t la variable independiente tiempo.

El gráfico para esta ecuación corresponde a:

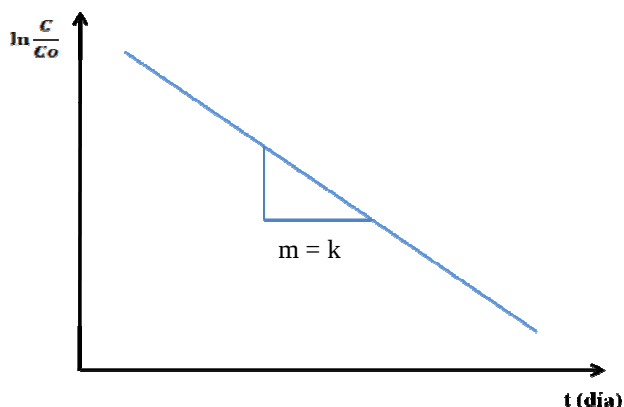


Figura 6. Gráfica de la ecuación de la recta.

Por medio de este desarrollo, se obtendrán las diferentes constantes de velocidad a diferentes temperaturas.

3.3.3 Determinación de la vida media del dispositivo de liberación. Una importante propiedad de la cinética de primer orden es el tiempo de vida media $t_{1/2}$. Este, es el tiempo requerido para que la concentración de semioquímico disminuya en un 50% en relación al valor inicial. El tiempo de vida media de cinéticas de primer orden es dependiente de la concentración. Es decir,

$$t_{1/2} = t, \text{ cuando } [C] = [C_0/2] \quad \boxed{\text{Ecuación 4}}$$

Recordando que: $\ln (C/C_0) = kt$

y reemplazando la ecuación 4 tenemos que:

$$\ln [(C_0/2)/C_0] = kt_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \ln (2)/k$$

$$t_{1/2} = 0,693/k \quad \boxed{\text{Ecuación 5}}$$

3.3.4 Determinación de la energía de activación mediante la ecuación de Arrhenius. La relación entre la constante de velocidad (k) y la temperatura absoluta (T) fue propuesta por Arrhenius:

$$k = Ae^{-E/RT}$$

Ecuación 6

Donde A es un factor de frecuencia, R corresponde a la constante de los gases, E es la energía de activación y T es la temperatura absoluta.

Aplicando logaritmo natural a la ecuación 6, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\ln(k) = -E/RT + \ln(A)$$

$$\ln(k) = -(E/R)(1/T) + \ln(A)$$

Ecuación 7

La ecuación 7 corresponde a la ecuación de la línea recta donde $\ln(k)$ es la variable dependiente, $-(E/R)$ es la pendiente, $1/T$ es la variable independiente y $\ln(A)$ es el intercepto. Si la función $\ln(k)$ es graficada en función de $1/T$, la energía de activación es igual a la pendiente de la línea recta para varias temperaturas. Una vez determinada la energía de activación (E), la constante de velocidad (k) a cualquier temperatura puede ser calculada por la ecuación de Arrhenius:

$$\ln(k_2/k_1) = E/R (T_2-T_1/T_2T_1)$$

Ecuación 8

3.4 Implementación de un experimento de campo

Después de realizado el experimento de laboratorio y obtenido los resultados que indicaron cual dispensador fue el más eficiente para ser utilizado en terreno, se procedió a la implementación del experimento de campo el cual comenzó en Enero de 2011.

Las parcelas de trébol rosado utilizadas en los experimentos se establecieron el 26 de septiembre de 2010. Para ello, se dispuso de un diseño de parcelas divididas o bloques de 7 x 9 m con subparcelas de 7 x 3 m del cultivar Quiñequeli-INIA y las líneas experimentales del INIA Syn Int VI y Syn II Pre III (Fig. 7). La dosis de semilla fue de 2,1 g/surco, la cual fue tratada con inoculante específico. La fertilización fue en base a fósforo y potasio aplicándose los productos Superfosfato Triple y Sulpomag, en dosis de 160 y 150 unidades, respectivamente.

En tres de las nueve parcelas que componían el experimento se dispusieron dispensadores con el atrayente o kairomona (*E*-2-hexenal). En otras tres parcelas se dispuso la alomona o repelente (limoneno), mientras que las restantes tres fueron utilizadas como control (dispensadores sin semioquímicos). Para ello se utilizaron estacas de fierro estriado A-44 de 8 mm de diámetro x 1,20 m de largo (Fig. 8A). Los dispensadores escogidos fueron las septas rojas de goma, las cuales fueron colocadas a 20 cm de altura, desde el suelo (Fig. 8B). El objetivo de las estacas y su longitud fue ir alzando la postura de los dispensadores a medida que se incrementaba el desarrollo de las plantas de trébol rosado (Fig. 8C). A cada septa se le agregó 50 µl de cada compuesto, las que fueron cambiadas cada siete días. En cada parcela se dispusieron 15 dispensadores, estableciéndose un total de 135 dispensadores para el ensayo.

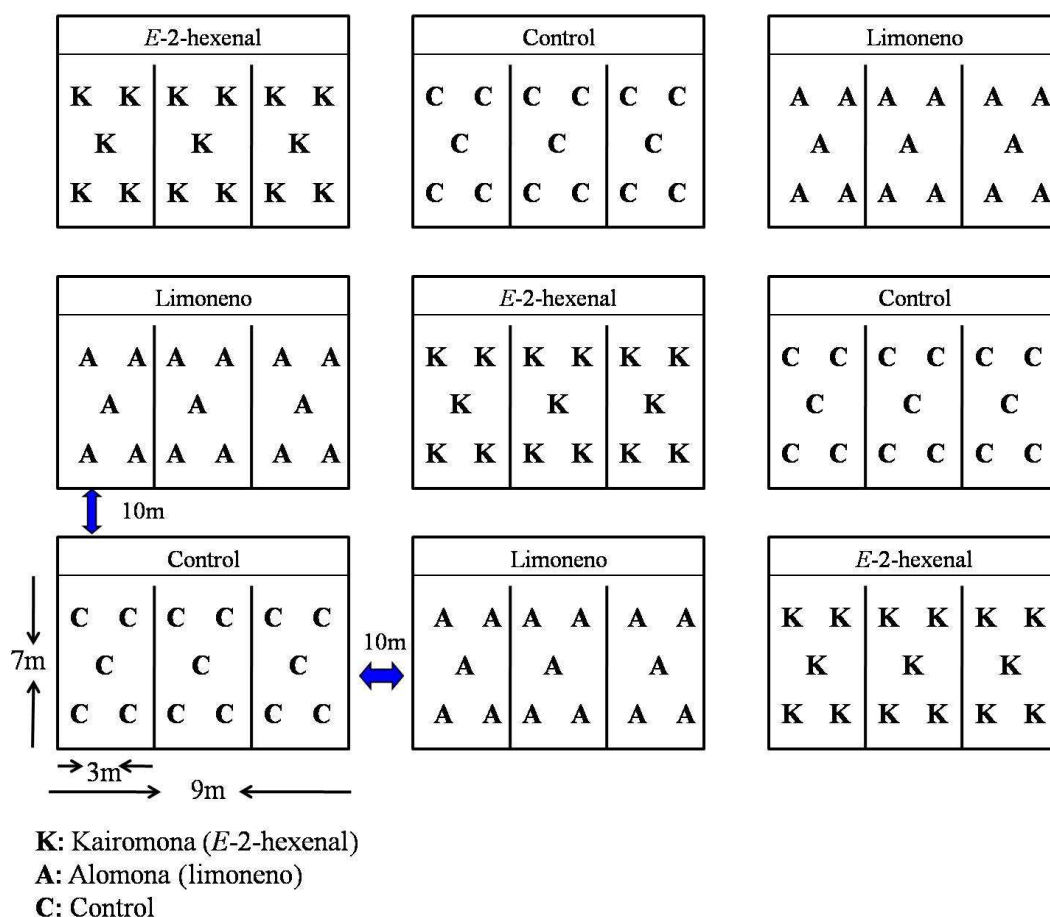


Figura 7. Distribución de los semioquímicos sobre parcelas de trébol rosado compuestas por el cv Quiñequeli-INIA y las líneas experimentales Syn II Pre III y Syn Int VI establecidas en la Estación Experimental INIA Carillanca.

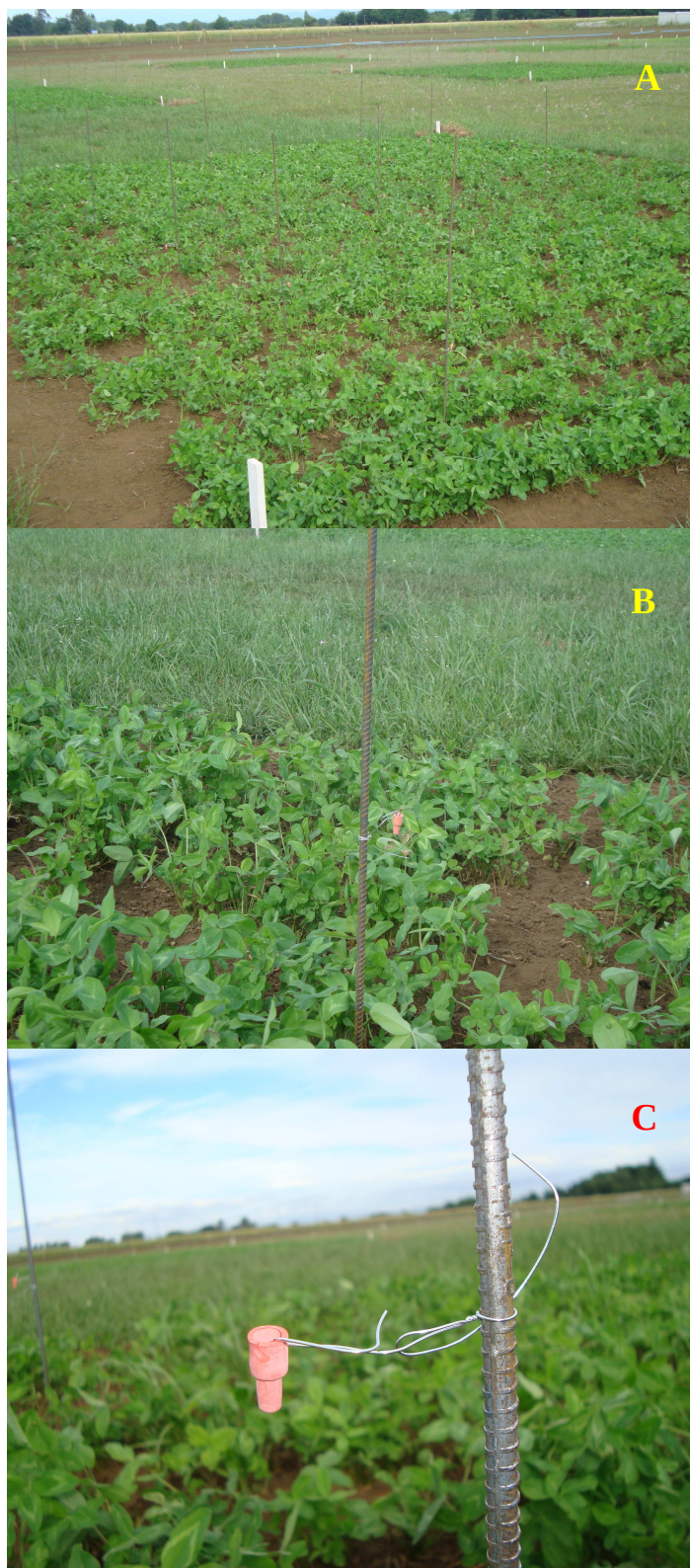


Figura 8. Experimento de campo. A) Parcelas experimentales de trébol rosado con dispensadores dispuestos en estacas de hierro, B) Estaca con dispensador ubicado en subparcela de trébol rosado, y C) Septa utilizada como dispensador en el experimento.

3.5 Evaluación de población de *Hylastinus obscurus* colonizando raíces y en período de vuelo

La población de *H. obscurus* fue evaluada en las raíces de trébol rosado mensualmente desde Enero a Diciembre de 2011. Un promedio de 12 plantas de cada cultivar y línea experimental fueron aleatoriamente seleccionadas desde cada sub-bloque y por triplicado. Las plantas fueron extraídas completas (parte aérea y radical) desde el suelo con ayuda de una pala; luego fueron depositadas y rotuladas en bolsas de papel y finalmente se transportaron al L.E.Q. de la Universidad de La Frontera. En dicho lugar, se separó la parte aérea de la radical y con ayuda de un bisturí se fueron cortando cuidadosamente las raíces para evaluar la presencia de *H. obscurus* en sus diferentes estados, ya sea embrionario (huevo) o post-embrionario (larva, pupa y adulto). Esta evaluación comenzó cuando las plantas tenían cuatro meses de edad.

Además de evaluar la población de *H. obscurus* de cada planta muestreada, se analizaron parámetros agronómicos tales como longitud de raíz y diámetro de corona, con el objetivo de estudiar el desarrollo y crecimiento de los distintas líneas y cultivar de trébol rosado. El objetivo de esta actividad fue registrar y comparar características relacionadas con el establecimiento, crecimiento y acumulación de reservas en la raíz, y como ello pudiese incidir en la resistencia y capacidad de sobrevivencia de las plantas hacia el ataque de herbívoros.

Los adultos de *H. obscurus* en periodo de vuelo fueron evaluados mediante el uso de trampas pegajosas (Fig. 9) adaptadas de las descritas por Ruther *et al.* (2000) y Quiroz *et al.* (2007). Estas trampas consistieron en una placa de acrílico (15 x 20 cm) cubierto de pegamento inerte (Adesivo X-135, 3M, Brasil) con un orificio central (5 x 5 cm), las que fueron sostenidas por dos cadenas colocadas en bordes opuestos. La cadena superior estaba unida a un soporte metálico y la inferior enterrada en el suelo. Este diseño permitió que la trampa girara según la dirección del viento. La evaluación de *H. obscurus* adheridas a esta trampas fue realizada durante el periodo de vuelo del insecto (Septiembre 2011 – Diciembre 2011). Cuatro trampas fueron colocadas en cada uno de los cuatro bordes del sitio experimental a una altura de 30 cm del suelo. Una vez por semana durante los meses de estudio, se contabilizó y sacaron con ayuda de pinzas metálicas, los insectos de las trampas. Esta actividad se realizó entre 11:00 y 16:00 h por día de muestreo.

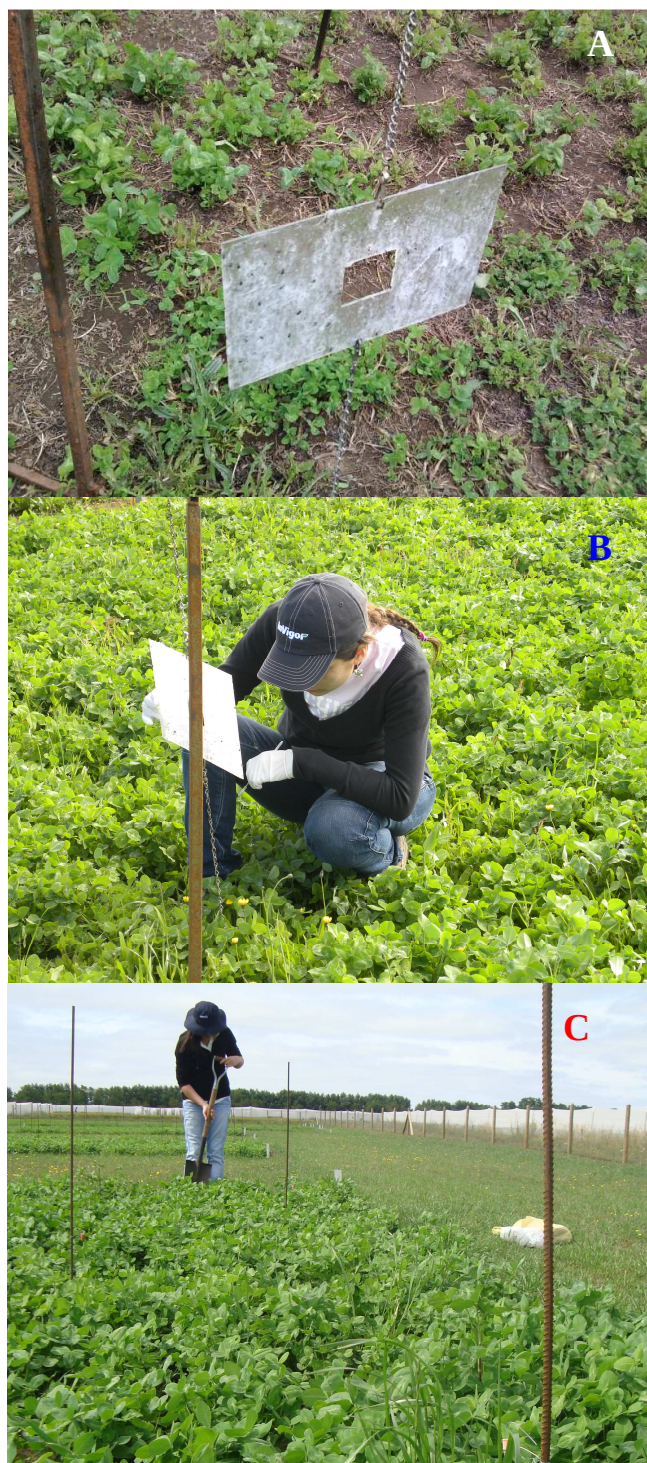


Figura 9. A) Trampa adhesiva utilizada para el monitoreo de *H. obscurus* en trébol rosado, en la Estación Experimental INIA Carillanca, Región de La Araucanía. B) Revisión de trampa adhesiva. C) Toma de muestras de plantas de trébol rosado, desde parcelas experimentales.

4. RESULTADOS

4.1 Determinación de las curvas de calibración

La figura 10A y 10B muestra la curva de calibración obtenida para limoneno y *E*-2-hexenal respectivamente.

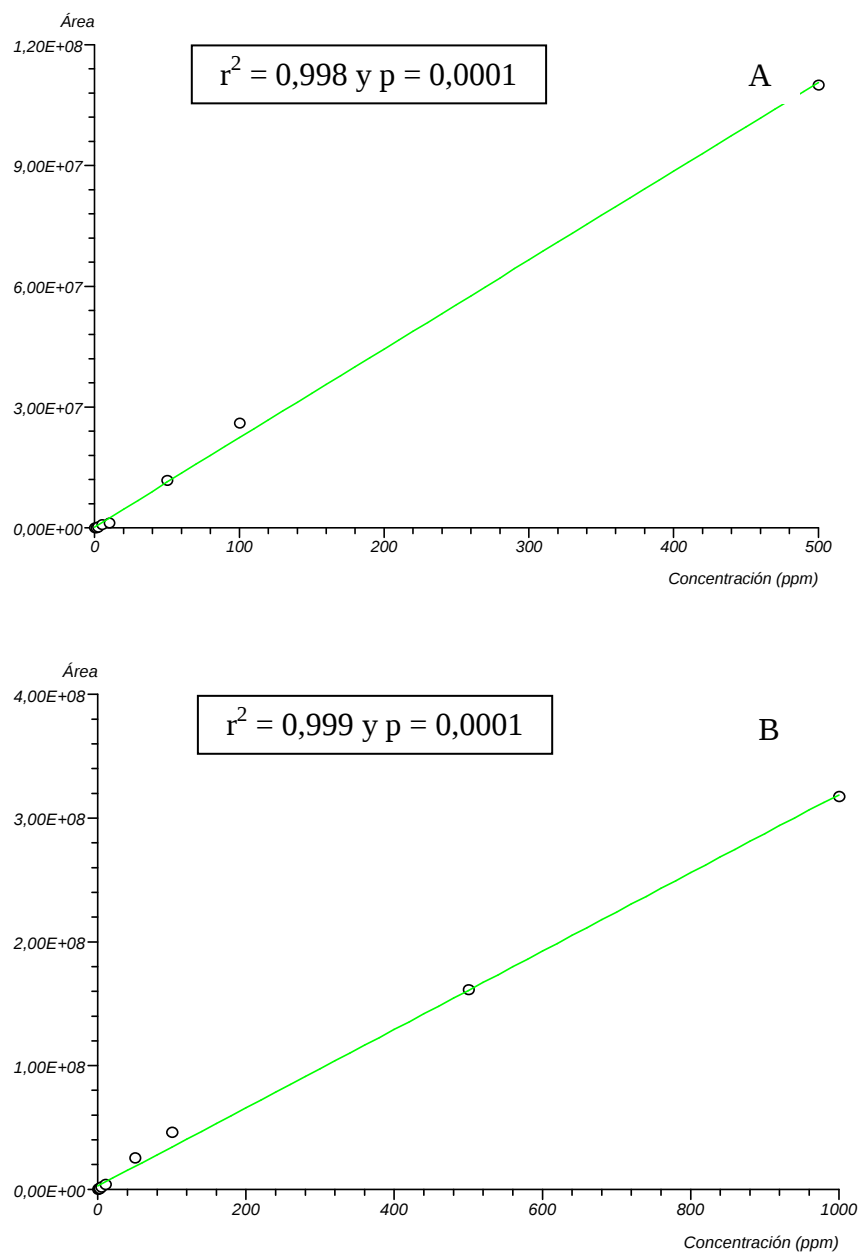


Figura 10. Curva de calibración para limoneno (A) y *E*-2-hexenal (B)

Mediante estas curvas de calibración fue posible evaluar la cantidad de semioquímico presente en las diferentes muestras. Estas concentraciones fueron usadas para calcular la constante de velocidad (k) para cada temperatura y tipo de dispositivo.

4.2 Determinación de la constante de velocidad para cada temperatura evaluada y para cada dispositivo

Las constantes de velocidad fueron calculadas elaborando gráficos de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\ln (C/C_0) = -kt$$

4.2.1 Limoneno. Las curvas de regresión lineal para limoneno sometido a diferentes temperaturas de cada uno de los tres dispositivos se muestran en las figuras 11, 12 y 13. Las pendientes de estas curvas corresponden a las constantes de velocidad, las que se presentan resumidas en la tabla 2. Estas constantes de velocidad serán usadas para calcular la energía de activación. Un análisis inicial de las curvas mostradas en las figuras 11-13, indica que el dispositivo 2 (septa de goma) sería el que mejor se comporta como dispositivo de liberación controlada para limoneno.

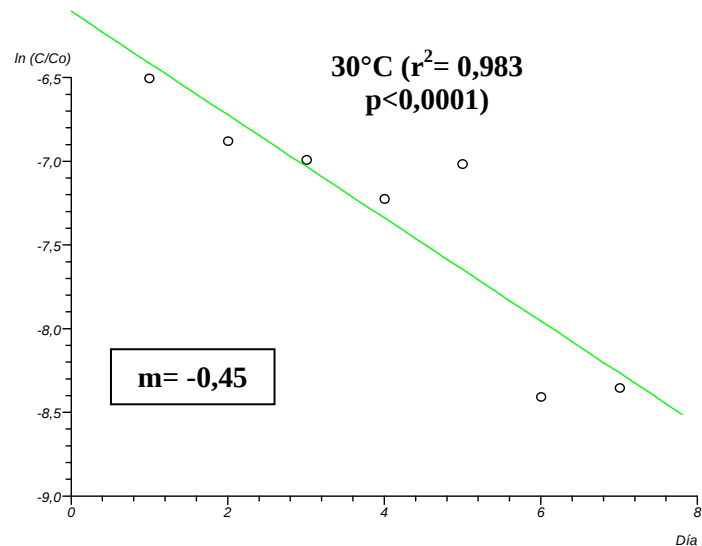
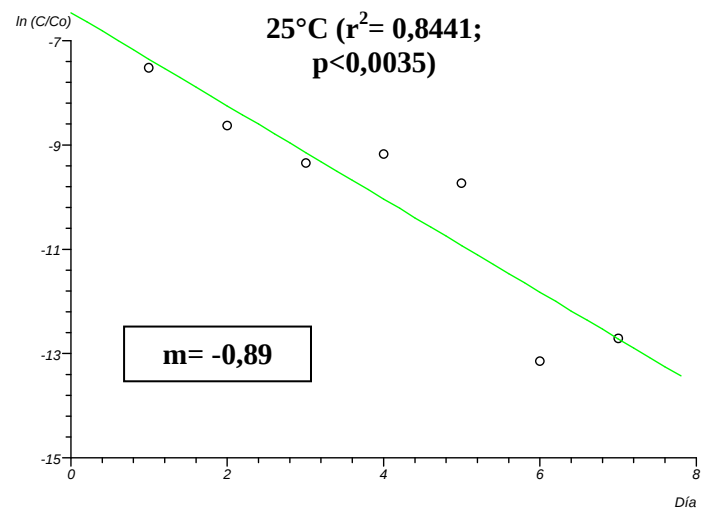
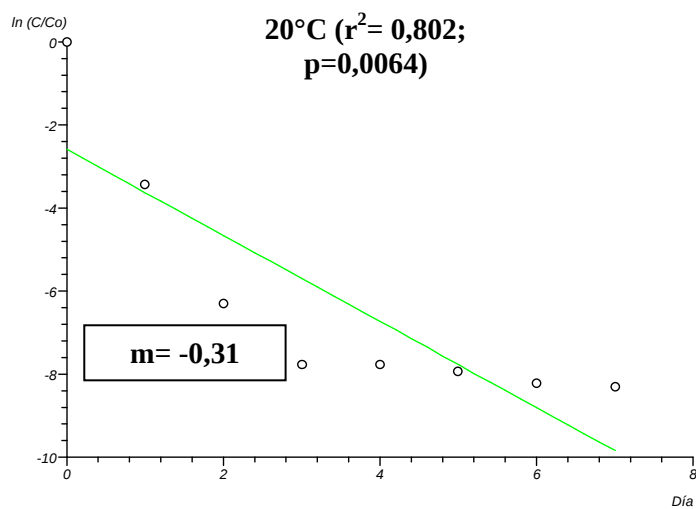
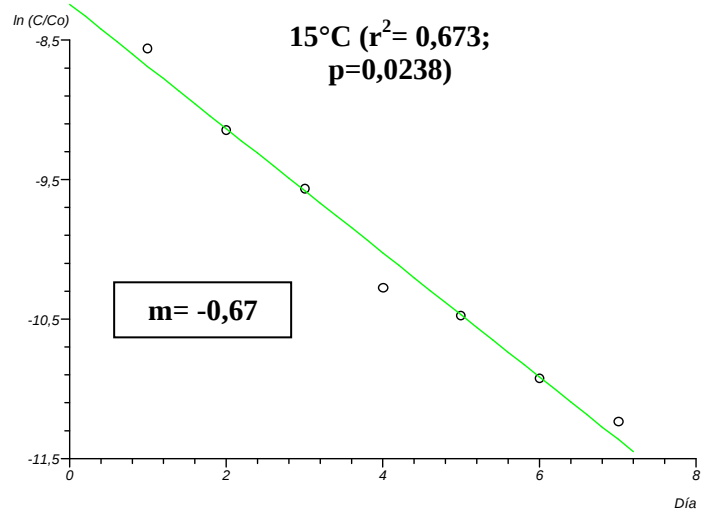
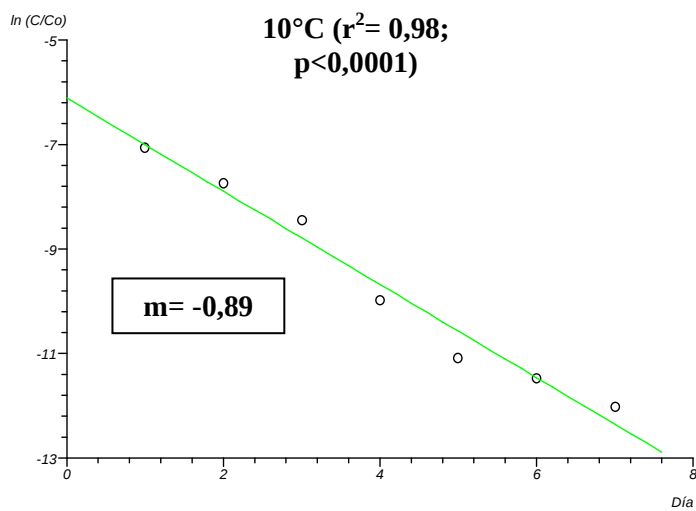


Figura 11. Curvas para obtener la constante de velocidad (k) de la disminución de limoneno en el dispositivo 1 (esponja) para diferentes temperaturas.

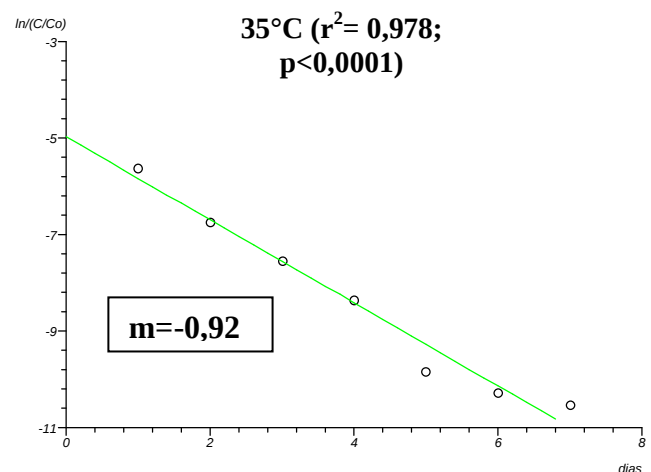
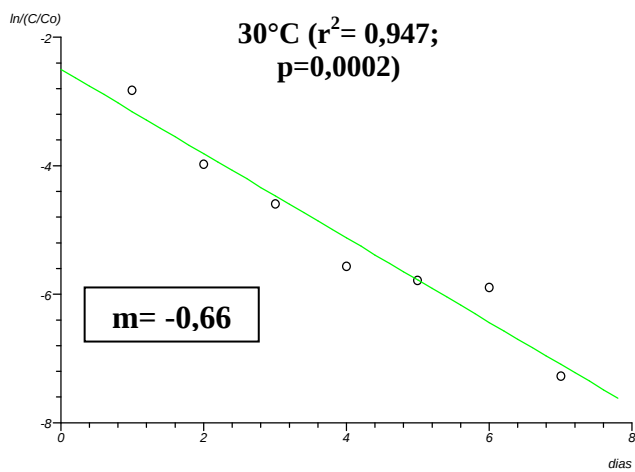
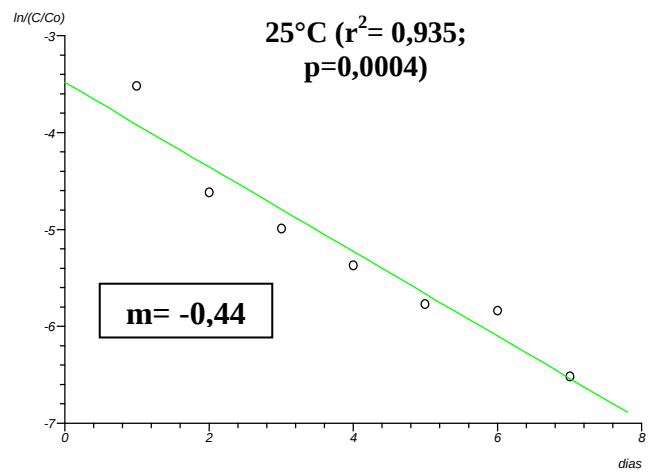
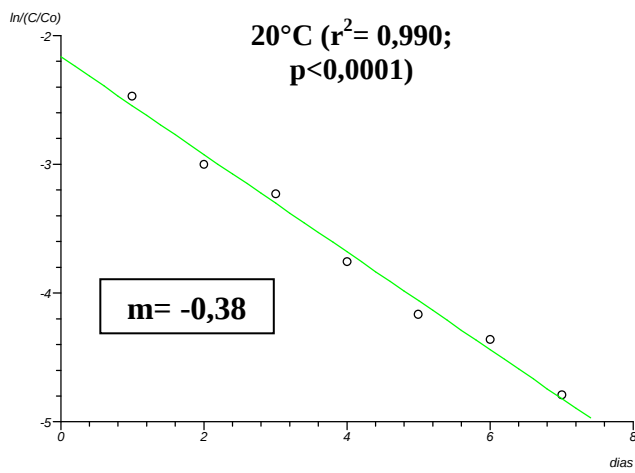
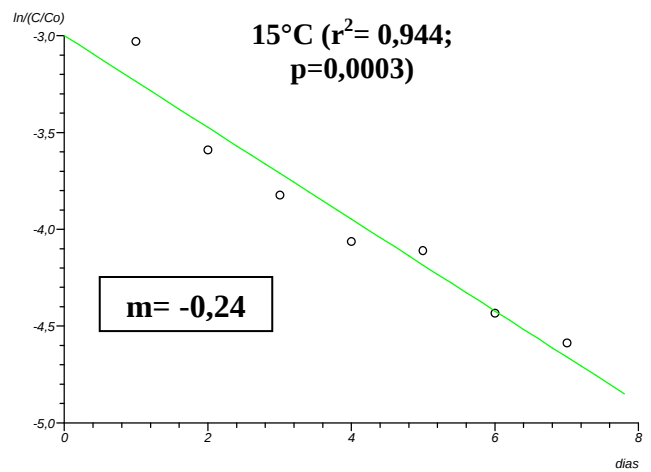
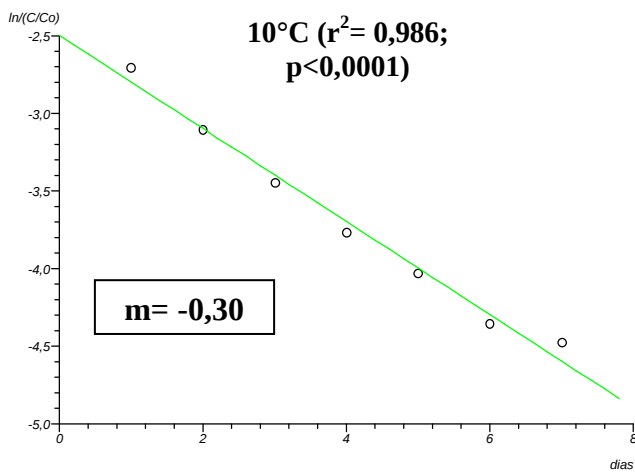


Figura 12. Curvas para obtener la constante de velocidad (k) de la disminución de limoneno en el dispositivo 2 (septa = rubber septum) para diferentes temperaturas.

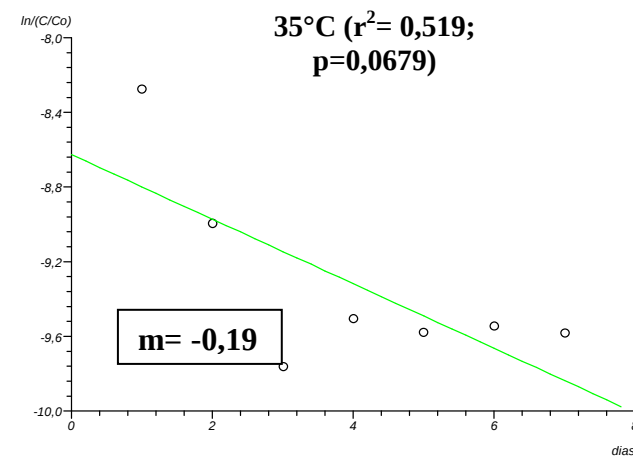
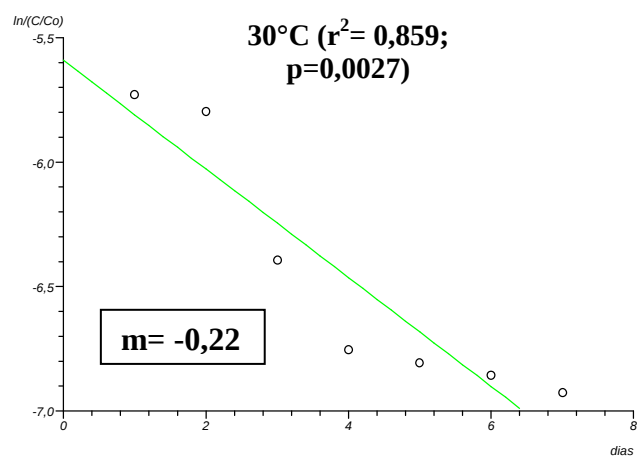
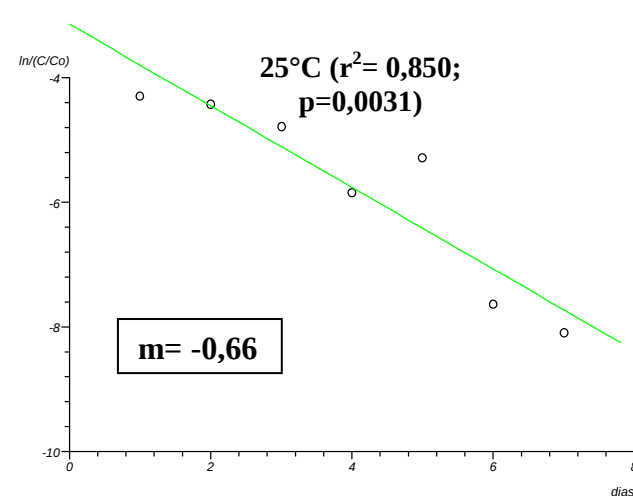
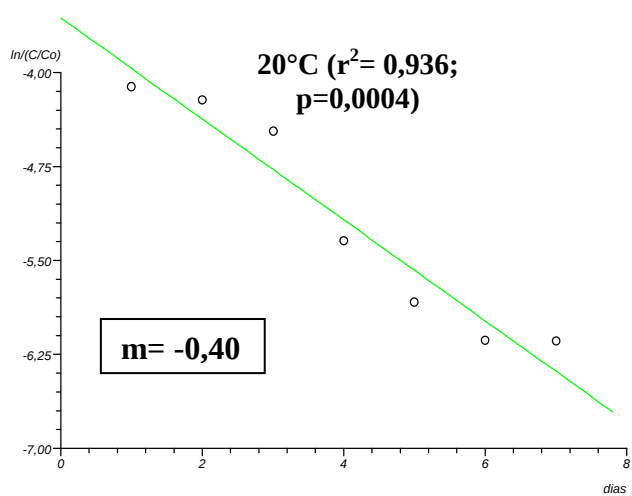
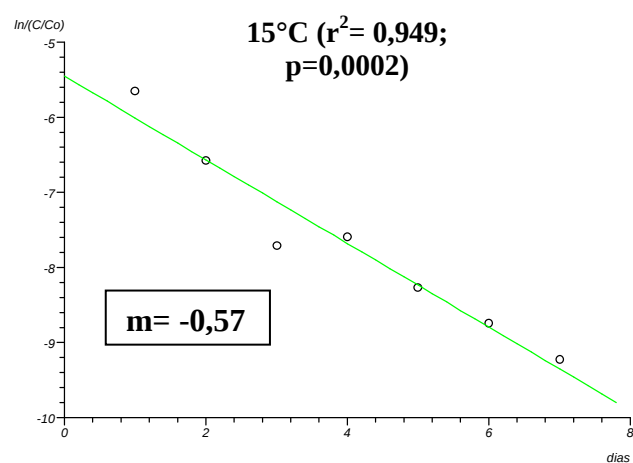
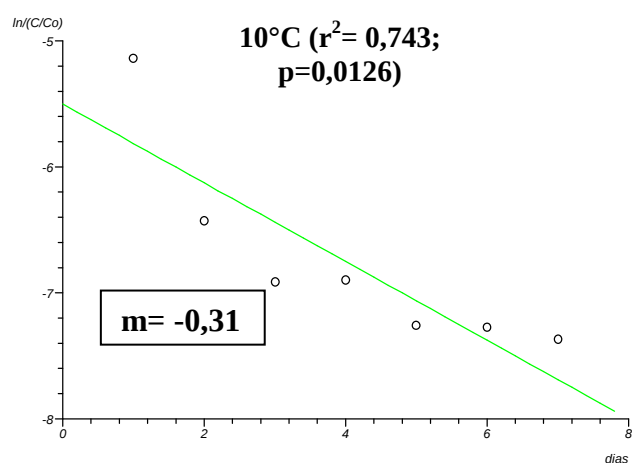


Figura 13. Curvas para obtener la constante de velocidad (k) de la disminución de limoneno en el dispositivo 3 (esponja con polietileno) para diferentes temperaturas.

Tabla 2. Constantes de velocidad a diferentes temperaturas para limoneno depositado en los tres dispositivos. D1= esponja; D2= septa de goma; D3= esponja en bolsa de polietileno.

Temperatura (°C)	k		
	D1	D2	D3
10	-0,89	-0,30	-0,31
15	-0,67	-0,24	-0,57
20	-0,31	-0,38	-0,40
25	-0,89	-0,44	-0,66
30	-0,45	-0,66	-0,22
35	-	-0,92	-0,19

4.2.2 *E*-2-hexenal. Las curvas de regresión lineal para *E*-2-hexenal sometido a diferentes temperaturas de cada uno de los tres dispositivos se muestran en las figuras 14, 15 y 16. Las pendientes de estas curvas corresponden a las constantes de velocidad, las que se pueden observar resumidas en la tabla 3. Estas constantes de velocidad serán usadas para calcular la energía de activación. Un análisis inicial de las curvas mostradas en las figuras 14-16, indica que el dispositivo 2 (septa de goma) sería el que mejor se comporta como dispositivo de liberación controlada para *E*-2-hexenal.

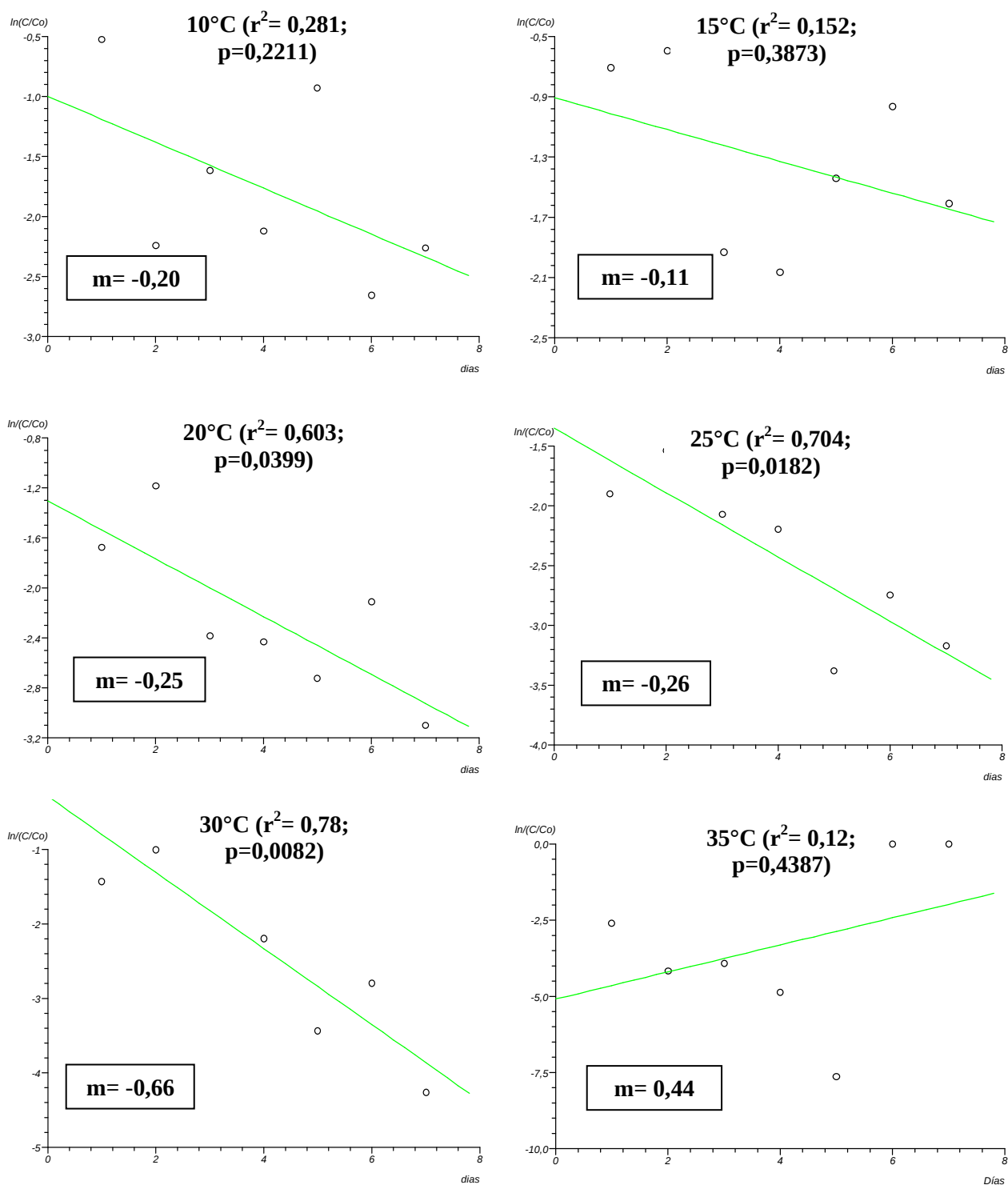


Figura 14. Curvas para obtener la constante de velocidad (k) de la disminución de E-2-hexenal en esponja para diferentes temperaturas.

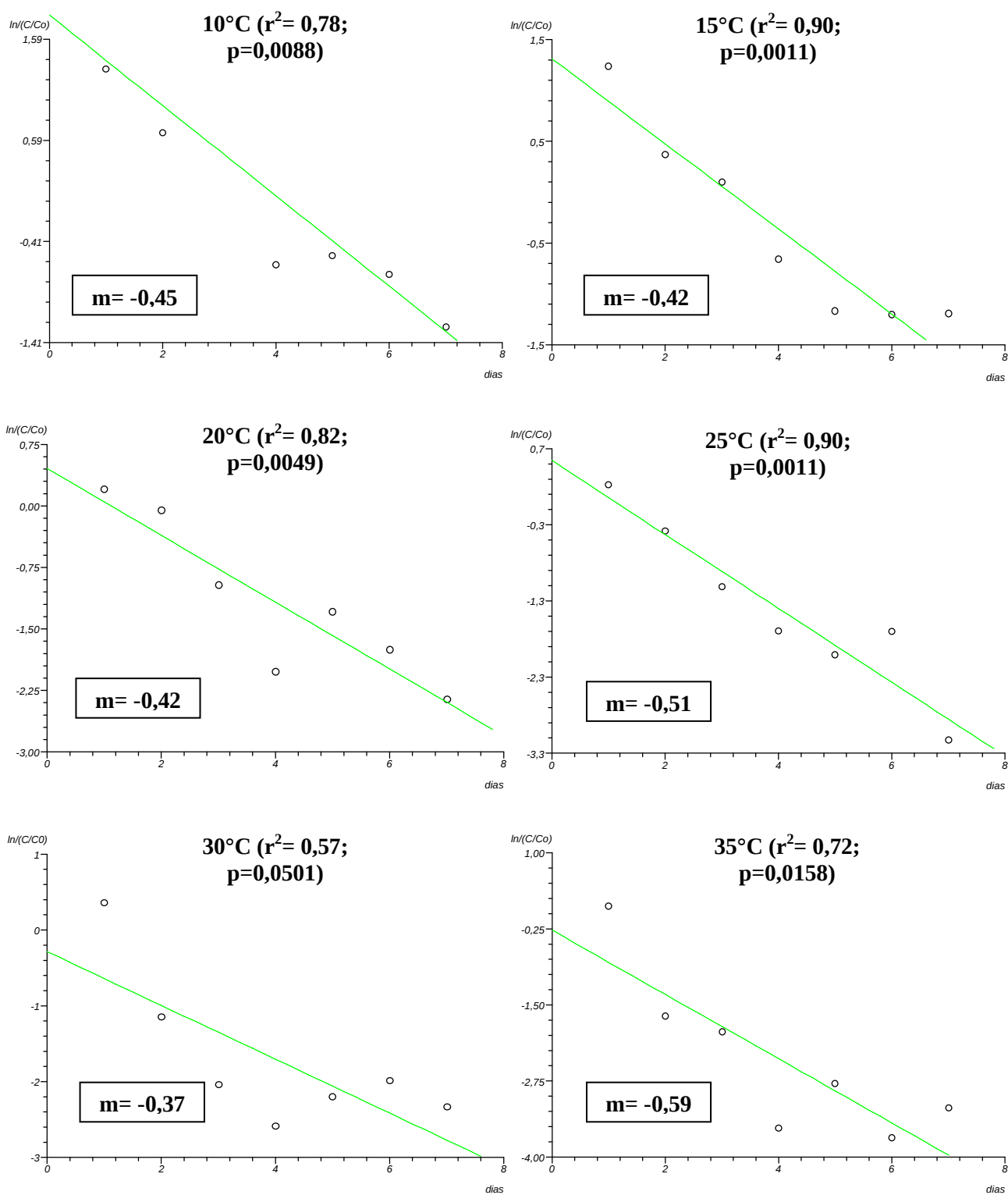


Figura 15. Curvas para obtener la constante de velocidad (k) de la disminución de E-2-hexenal en septa (rubber septum) para diferentes temperaturas.

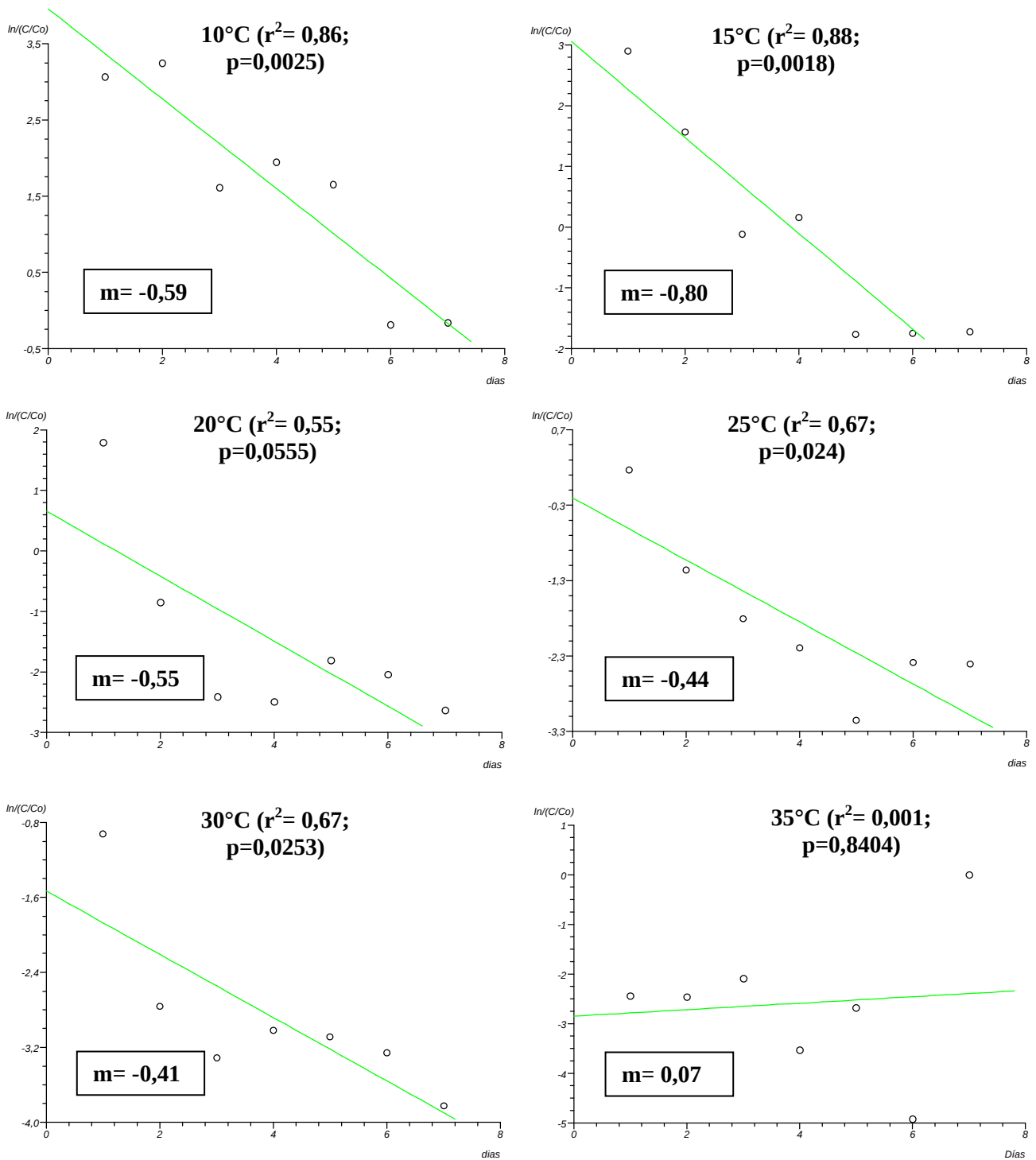


Figura 16. Curvas para obtener la constante de velocidad (k) de la disminución de E-2-hexenal en esponja con polietileno para diferentes temperaturas.

Tabla 3. Constantes de velocidad a diferentes temperaturas para *E*-2-hexenal depositado en los tres dispositivos. D1= esponja; D2= septa de goma; D3= esponja en bolsa de polietileno.

Temperatura (°C)	k		
	D1	D2	D3
10	-0,20	-0,45	-0,59
15	-0,11	-0,42	-0,80
20	-0,25	-0,42	-0,55
25	-0,26	-0,51	-0,44
30	-0,66	-0,37	-0,41
35	-	-0,59	-

4.3 Determinación de la energía de activación mediante la ecuación de Arrhenius

Las energías de activación fueron determinadas mediante la ecuación de Arrhenius:

$$\ln(k) = -(E/R)(1/T) + \ln(A)$$

La pendiente de la gráfica que relaciona $\ln(k)$ versus $1/T$ corresponderá a la energía de activación.

4.3.1 Limoneno

Tabla 4. Constantes de velocidad de limoneno transformadas a su forma logarítmica.

1/T x 1.000 (K)	ln(k)		
	D1	D2	D3
3,534	-0,11653382	-1,2039728	-1,17118298
3,472	-0,40047757	-1,43969514	-0,56211892
3,413	-1,17118298	-0,97021907	-0,91629073
3,556	-0,11653382	-0,82782208	-0,41551544
3,300	-0,7985077	-0,42007126	-1,51412773
3,247	-	-0,08012604	-1,66073121

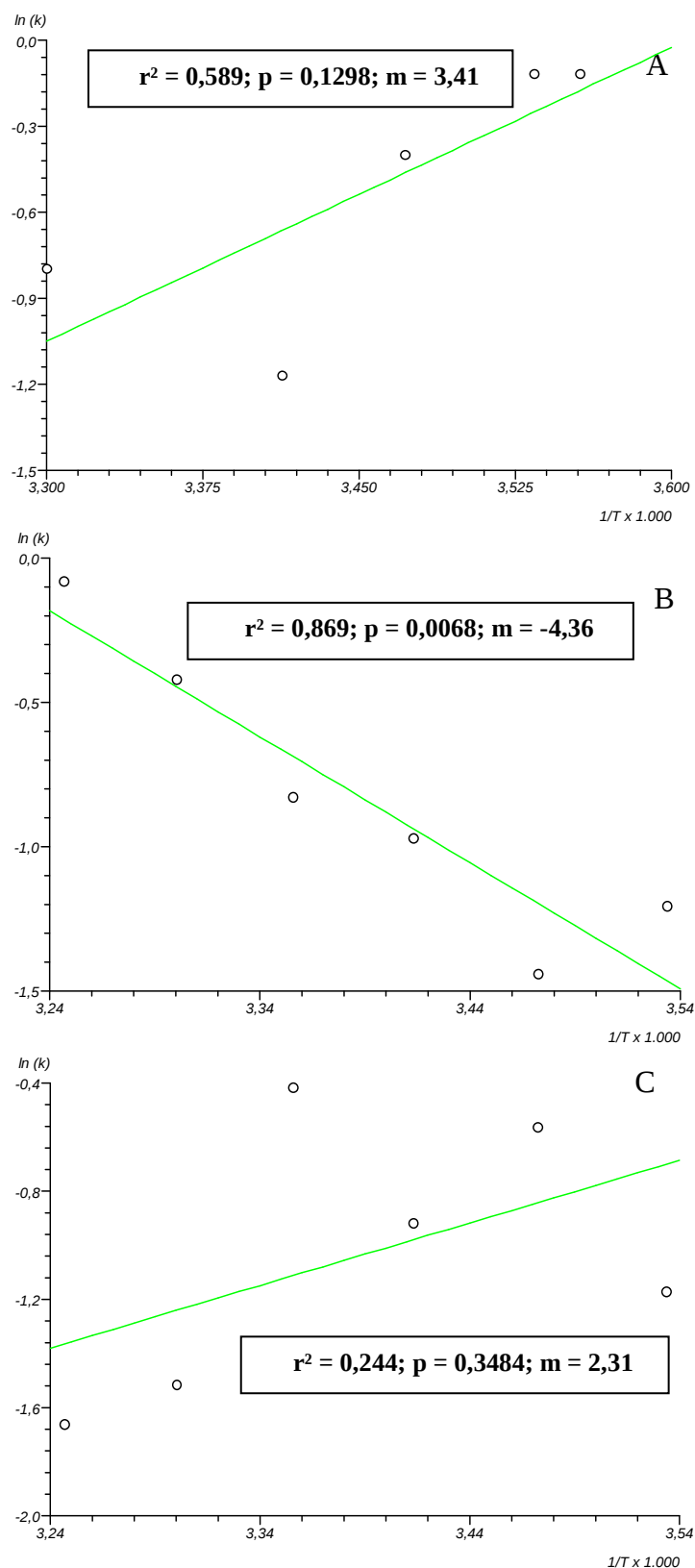


Figura 17. Resultado de las energías de activación de limoneno en dispositivo 1 (A= esponja), dispositivo 2 (B = septa de goma) y dispositivo 3 (C = esponja en bolsa de polietileno).

4.3.2 *E*-2-Hexenal

Tabla 5. Constantes de velocidad de *E*-2-hexenal transformadas a su forma logarítmica

1/T x 1.000	ln(k)		
	D1	D2	D3
3,534	-1,60943791	-0,7985077	-0,52763274
3,472	-2,20727491	-0,86750057	-0,22314355
3,413	-1,38629436	-0,86750057	-0,597837
3,556	-1,34707365	-0,67334455	-0,83098055
3,300	-0,41551544	-0,99425227	-0,89159812
3,247	-	-0,52763274	-

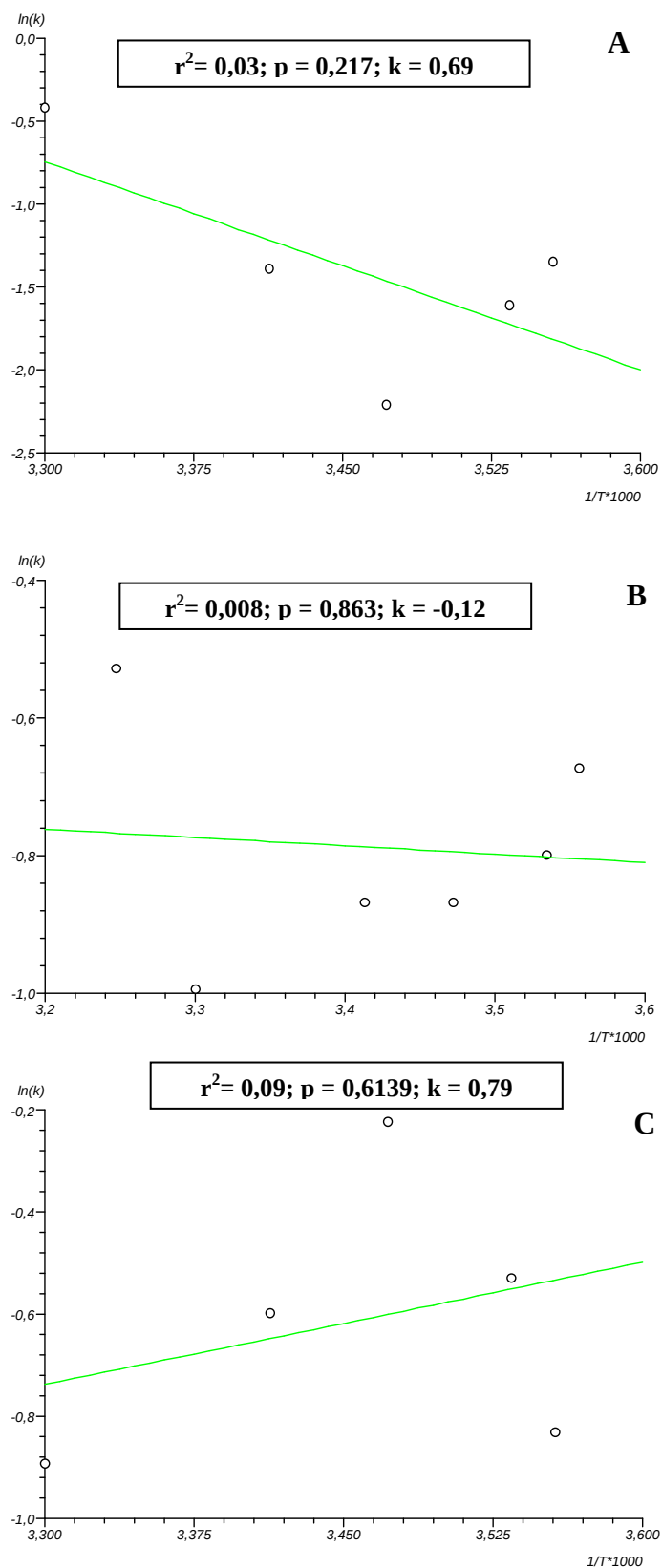


Figura 18. Resultado de las energías de activación de E-2-hexenal en dispositivo 1 (A= esponja), dispositivo 2 (B = septa de goma) y dispositivo 3 (C = esponja en bolsa de polietileno).

4.4. Determinación de la vida media del dispositivo de liberación.

La vida media de cada dispositivo a las diferentes temperaturas se puede evaluar mediante la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = 0,693/k$$

Como el dispositivo 2 (septa de goma) resultó ser el mejor durante los ensayos con limoneno y *E*-2-hexenal, se determino la vida media de ambos, la cual se muestra en la tabla 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. Vida media de limoneno en dispositivo 2 (septa de goma)

t (°C)	k	t _{1/2} (días)
10	-0,3	-2,31
15	-0,237	-2,92
20	-0,379	-1,83
25	-0,437	-1,59
30	-0,657	-1,05
35	-0,923	-0,75

Tabla 7. Vida media de *E*-2-hexenal en dispositivo 2 (septa de goma)

t (°C)	k	t _{1/2} (días)
10	-0,45	-1,54
15	-0,42	-1,65
20	-0,42	-1,65
25	-0,51	-1,36
30	-0,37	-1,87
35	-0,59	-1,17

4.5. Determinación de constantes de velocidad a una temperatura dada

Una de las aplicaciones del cálculo de la energía de activación es la posibilidad de predecir la constante de velocidad (k) a cualquier temperatura mediante la ecuación de Arrhenius:

$$\ln(k_2/k_1) = E/R (T_2-T_1/T_2T_1)$$

Por ejemplo, cuál sería el valor de k para limoneno en la septa de goma a 28°C ? Para contestar esta pregunta se necesita un valor de k correspondiente a una temperatura superior, por ejemplo k = -0,657 (Tabla 6), obtenida a 30°C. El valor de E es -4,36, que corresponde a la pendiente de la recta mostrada en la figura 17B, R es la constante de los gases (1,987 cal/mol K)

$$\ln(-0,657/k_1) = (-4,36/1,987) (303-301)/303*301)$$

$$\ln(-0,657/k_1) = 4,8 \times 10^{-5}$$

$$-0,657/k_1 = 1,000048$$

$$k_1 = -0,6569$$

4.6 Evaluación de población de *Hylastinus obscurus* colonizando raíces y en período de vuelo

Las tablas 8 y 9 muestran las evaluaciones de la presencia de *H. obscurus* en las raíces de plantas de trébol rosado. No se observaron insectos en los bloques del cultivar Quiñequeli-INIA, Syn In VI y Syn II Pre II tratados con el repelente limoneno, en cambio se observaron 2 insectos en las raíces de Quiñequeli-INIA y Synt Int VI tratadas con el atrayente E-2-hexenal. La tabla 10 muestra que durante el periodo de evaluación *H. obscurus* se encontraba en periodo de vuelo, ya que las trampas pegajosas lograron atrapar tres individuos adultos.

Tabla 8. Parámetros evaluados en dos líneas experimentales y un cultivar de trébol rosado, en parcelas tratadas con limoneno.

Fecha	Syn Int VI			Quiñequeli-INIA			Syn II Pre III		
	Diámetro Corona (mm)	Longitud Raíz (cm)	Nº Insectos	Diámetro Corona (mm)	Longitud Raíz (cm)	Nº Insectos	Diámetro Corona (mm)	Longitud Raíz (cm)	Nº Insectos
27/12/2010	4,07±0,16	14,43±0,75	0	4,91±0,25	15,26±0,87	0	4,92±0,25	15,5±0,97	0
25/01/2011	5,36±0,32	14,53±0,61	0	5,84±0,42	13,95±1,11	0	5,87±0,45	12,98±0,69	0
14/02/2011	5,55±0,41	16,76±0,85	0	5,93±0,60	13,05±0,93	0	7,45±1,88	14,81±1,28	0
23/03/2011	8,11±0,67	14,96±0,98	0	7,90±0,51	14,64±0,67	0	7,64±0,61	15,56±0,98	0
18/04/2011	9,46±0,48	17,86±1,47	0	8,12±0,39	16,93±1,46	0	9,98±0,50	17,66±1,12	0
31/05/2011	10,34±1,03	19,91±1,20	0	10,68±1,42	19,29±1,58	0	11,54±1,02	19,51±1,37	0
30/06/2011	13,88±1,53	16,50±0,95	0	11,72±0,92	17,26±0,98	0	12,66±1,40	16,67±1,66	0
10/08/2011	10,85±0,59	19,41±1,51	0	8,7±0,45	16,26±1,0	0	10,75±0,80	20,36±2,12	0
14/09/2011	16,66±1,16	15,59±2,14	0	18,18±0,71	9,58±0,83	0	23,42±2,80	16,52±1,29	0
26/10/2011	12,00±0,82	17,44±1,07	0	14,31±1,99	15,79±0,86	0	16,9±1,42	14,04±0,57	0
22/11/2011	11,61±1,06	15,85±0,94	0	13,14±0,89	19,36±1,94	0	12,07±1,00	17,05±1,94	0
20/12/2011	10,35±0,58	13,68±1,24	0	7,94±0,38	16,55±1,14	0	10,97±0,99	16,1±0,58	0

Tabla 9. Parámetros evaluados en dos líneas experimentales y un cultivar de trébol rosado, en parcelas tratadas con *E-2-hexenal*.

Fecha	Syn Int VI			Quiñequeli-INIA			Syn II Pre III		
	Diámetro Corona (mm)	Longitud Raíz (cm)	N° Insectos	Diámetro Corona (mm)	Longitud Raíz (cm)	N° Insectos	Diámetro Corona (mm)	Longitud Raíz (cm)	N° Insectos
27/12/2010	4,92±0,28	16,15±0,71	0	3,95±0,20	14,64±0,89	0	4,24±0,29	15,90±1,02	0
25/01/2011	6,03±0,31	16,17±1,45	0	5,75±0,28	13,29±0,66	0	5,91±0,36	14,00±0,55	0
14/02/2011	6,48±0,61	15,73±0,67	0	6,10±0,42	14,08±1,00	0	6,38±0,23	16,40±0,76	0
23/03/2011	8,48±0,93	18,37±1,95	0	7,40±0,36	15,02±0,96	0	7,94±0,78	15,28±1,29	0
18/04/2011	8,77±0,72	17,23±1,03	0	8,61±0,22	19,33±1,28	0	8,01±0,87	17,76±1,18	0
31/05/2011	12,04±0,98	21,24±2,20	0	8,79±0,53	17,59±1,49	0	10,96±0,90	18,00±0,85	0
30/06/2011	11,86±0,82	17,09±1,65	0	10,21±1,01	15,10±0,80	0	13,89±1,82	15,20±1,03	0
10/08/2011	10,28±0,85	16,84±1,45	0	8,88±0,45	15,73±0,99	0	11,22±0,63	21,76±0,74	0
14/09/2011	16,41±1,23	14,26±1,02	0	17,16±0,99	11,67±1,12	0	20,66±1,29	14,62±0,90	0
26/10/2011	11,36±1,60	21,82±2,33	0	10,65±1,17	17,90±1,36	0	12,64±1,07	16,99±1,13	0
22/11/2011	14,23±1,40	18,5±1,63	0	15,47±0,75	21,35±2,82	0	14,5±1,03	17,00±0,84	0
20/12/2011	12,51±1,10	14,15±1,37	1	0,74±0,66	16,63±1,37	1	11,58±0,94	17,70±0,87	0

Tabla 10. Monitoreo de *H. obscurus* en trampas pegajosas ubicadas en parcelas de trébol rosado, en la Estación Experimental INIA Carillanca.

Fecha muestreo	Trampa 1 N° individuos	Trampa 2 N° individuos	Trampa 3 N° individuos	Trampa 4 N° individuos
26-10-2011	0	0	1	1
04-11-2011	1	0	0	0
17-11-2011	0	0	0	0
09-12-2011	0	0	0	0
16-12-2011	0	0	0	0
29-12-2011	0	0	0	0

5. DISCUSIÓN

El manejo de plagas es una parte integral de la agricultura moderna y su eficacia puede, en muchos casos, hacer la diferencia entre el éxito o el fracaso de los agricultores. El daño causado por plagas se ha estimado entre el 35 y 40% de todos los cultivos (Pimentel, 1991). El MIP (Kogan, 1998) y el manejo integrado de cultivos (ICM, sigla en inglés) (Copping, 2001) son los principales conceptos en el manejo de plagas, los cuales están relacionados con el desarrollo de una agricultura ambientalmente más amigable.

Los semioquímicos (Nordlund, 1981) son usados en el ICM para monitorear poblaciones de plagas, la mayoría insectiles, atrapamiento masivo y disrupción de cópula (Bakke & Lie, 1985; Campion *et al.*, 1985; Wall, 1985). Estas sustancias, en todos los métodos de aplicación, son liberadas a la atmósfera desde dispositivos que son esparcidos en el campo. Entre los desarrollados para la liberación controlada de semioquímicos se encuentran septas de goma, diferentes dispensadores, cartones impregnados, fibras y tubos de polietileno (Weatherstone, 1990), todos ellos aplicados de manera manual.

En años recientes se han desarrollado experimentos de campo a gran escala probando semioquímicos relacionados con comunicación sexual (feromonas sexuales) (Mayer & Mitchell, 1998). Se han usado una gran variedad de dispensadores basados en diferentes tipos de polímeros y sustancias naturales (Yosha *et al.*, 2008), sin embargo existe una falta de información relativa a mediciones físico-químicas involucradas en la liberación de estas sustancias desde los dispensadores.

Existe por lo tanto, una necesidad de establecer y aplicar modelos de velocidad de liberación del semioquímico desde los dispensadores para así poder comprender de una mejor forma los mecanismos y limitaciones asociados con el control y monitoreo de plagas.

Algunos autores han informado modelos predictivos de velocidad de liberación de feromonas en función del tiempo o de los grados-día (Audemard & Leblon, 1987; Loriatti y Dalla Serra, 1992; Neuman, 1992; Charmillot & Pasquier, 1993), pero no han calculado velocidades de liberación instantáneas, descrito los mecanismos involucrados, o predicho tasas de liberación bajo variadas condiciones.

Uno de los principales factores que afectan la velocidad de liberación del semioquímico es la temperatura. Bradley *et al.* (1995) propusieron uno de los primeros modelos. Los autores usaron tubos de polietileno como dispensadores y el modelo se basó en la longitud de la columna de semioquímico en el tubo de polietileno. Los autores asumieron que la velocidad de liberación era proporcional a la longitud del capilar y a la conductancia térmica de la pared del dispensador de plástico.

La velocidad de la emisión del ingrediente activo es un factor crítico que afecta la eficacia del semioquímico en el manejo de plagas. Desde un punto de vista del manejo de plagas de insectos, es deseable tener un dispositivo que pueda liberar el semioquímico a una velocidad constante. En la práctica, tal dispositivo podría ser difícil de fabricar. Capilares de vidrio como dispositivos de velocidad de liberación controlada han sido desarrollados desde 1980. Sin embargo, variados informes han indicado que fibras cargadas con feromonas usadas comercialmente en estrategias de control de insectos tienen un pobre desempeño en comparación con la predicha (Wheatherson *et al.*, 1995). Los métodos más ampliamente usados para medir la velocidad de liberación son medir la fase gaseosa y examinar el contenido residual por medio de la medición de pérdida de peso o análisis por extracción con solvente de las muestras expuestas en el laboratorio o campo. Sin embargo, la principal desventaja es el tiempo que se ocupa en estos análisis, requiriendo meses o aún años para obtener resultados.

En este trabajo se usó el modelo cinético propuesto por Zhang (2005), en orden de obtener de manera rápida la tasa de liberación a cualquier temperatura. Además este acercamiento físico-químico permite predecir el comportamiento a diferentes temperaturas, calcular la vida media del dispositivo con semioquímico y calcular constantes de velocidad a una temperatura determinada.

Es así como este trabajo se dividió en dos etapas, el objetivo de la primera fue buscar el mejor dispositivo entre una esponja, una septa de goma y una esponja en bolsa de polietileno; en una segunda el objetivo fue probar el mejor dispositivo bajo condiciones de campo.

El efecto de la temperatura tuvo una mayor incidencia sobre los dispositivos basados en esponja. Las mejores correlaciones lineales para obtener las constantes de velocidad fueron obtenidas para el dispositivo de septa de goma con limoneno (Fig. 12; $r^2 > 0,9$).

Comportamiento parecido fue observado para *E*-2-hexenal (Fig.15), aunque los valores de r^2 fueron menores ($0,57 < r^2 < 0,9$). Estos resultados coinciden con lo informado por Zhang (2005), quien encontró que la septa de goma era uno de los mejores dispositivos para ser usado como sistema de liberación controlada.

El cálculo de la energía de activación, nos da una idea de la estabilidad del sistema. Si la relación entre la temperatura y la constante de velocidad (ecuación de Arrhenius) es lineal ($p < 0,05$), indica que el sistema es estable, y por ende es posible predecir comportamientos físico-químicos. El análisis de este parámetro se muestra en las figuras 17 y 18. En ellas es posible observar que la septa de goma es la más estable para limoneno (Fig. 17B; $p = 0,0068$). Esto no es muy claro para *E*-2-hexenal ya que ninguno de los dispositivos se comportaron estables (Fig. 18A-C; $p > 0,05$). Esto podría ser explicado debido a la alta presión de vapor de este compuesto en comparación con el limoneno. Esto sugeriría que se debiera aumentar la densidad y/o disminuir la porosidad del dispositivo para *E*-2-hexenal.

La vida media de limoneno incorporado en las septas de goma es dependiente de la temperatura (Tabla 6), variando entre 3 y 1 día, lo que significa que la efectividad del dispositivo variaría entre 6 y 2 días. Este valor no está muy alejado del informado por Zhang (2005), quien señaló que la vida media de disparlure, la feromona sexual de la polilla gitana, incorporado en septa de goma era de 3,7 días a 35°C.

La efectividad de la formulación semioquímico-septa de goma fue probada en un experimento de campo el cual contempló la incorporación de limoneno y *E*-2-hexenal en septas de goma a una dosis de 50 μ L. La aplicación se realizó sobre un diseño de parcelas divididas las cuales contenían Quiñequeli-INIA y dos líneas experimentales Sin Int VI y Syn II Pre III. El cambio de septas fue cada siete días y la evaluación de la presencia de *H. obscurus* en campo experimental fue realizada mensualmente. Los resultados después de un año de ensayo mostraron que no se encontraron individuos de *H. obscurus* en las parcelas tratadas con limoneno (Tabla 8). Este compuesto había mostrado características de repelencia hacia este curculiónido en experimentos de laboratorio (Tapia *et al.*, 2007). En cambio, se encontraron barrenadores en las parcelas tratadas con el atrayente *E*-2-hexenal, compuesto que había mostrado esta propiedad bajo condiciones de laboratorio (Tapia *et al.*, 2007). Al respecto, Pureswara *et al.* (2004) afirman que limoneno repele al escolítido *Dendroctonus brevicomis*; de esta manera la resistencia de *Pinus ponderosa* a la colonización por este

escolítido está correlacionada con un aumento de la concentración de limoneno en la resina (Macías-Samano, 1998). Lee *et al.* (2001) y Tripathi *et al.* (2003) mencionan los efectos ovicidas, inhibidor de oviposición y el efecto tóxico para adultos de tres escarabajos de productos almacenados *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae*, *Tribolium castaneum*. Estos antecedentes, además de la actividad en campo de este compuesto sobre *H. obscurus* permite sugerir su potencial uso como bioindicador de plantas resistentes a este curculiónido o su aplicación como repelente.

Por otro lado, la actividad atractante de *E*-2-hexenal bajo condiciones de campo, está soportado por datos de literatura que muestran que este compuesto es una kairomona en diferentes especies de coleópteros (Visser *et al.*, 1979; Prokopy *et al.*, 2001). Vrkocova *et al.* (2000) hacen referencia a la actividad atrayente de *E*-2-hexenal sobre el escolítido *Scolytus intricatus*.

Por último, el modelo aplicado en este estudio provee las bases para predecir la probabilidad de la durabilidad de los dispensadores en un periodo determinado. Además, los parámetros físico-químicos evaluados en este estudio pueden ser usados como estándares para evaluar la diseminación desde diferentes dispensadores de semioquímicos a diferentes condiciones de temperatura.

6. CONCLUSIONES

La evaluación de la temperatura sobre la tasa de liberación de los semioquímicos fue el punto clave para la elección del mejor dispensador. Lo más relevante de esta investigación fue la escasez de estudios relacionados con el tema, factor que hace más complejo el estudio ya que no se contó con una amplia fuente de consulta para el desarrollo de esta tesis. Aún así, se lograron resultados que aportan importantes logros a la investigación y sobre todo que sugieren el uso de este experimento como modelo para el estudio de otros sistemas que potencialmente puedan ser incorporados en el Manejo Integrado de Plagas (MIP).

La eficacia que presentó el dispensador 2 (septa de goma) en el estudio experimental a través de la determinación de la curva de liberación de los compuestos, permiten sugerir su uso en métodos de control y monitoreo de *Hylastinus obscurus*.

La determinación de las constantes de velocidad para cada temperatura resultaron útiles para definir el tiempo de vida media de los semioquímicos y con ello definir cada cuanto tiempo se debe hacer la nueva aplicación de compuestos.

Los datos reportados en las tablas 8, 9 y 10 confirman la presencia del barrenador en las parcelas establecidas para este experimento, encontrándose insectos a nivel de raíces, en aquellas que estaban tratadas con *E-2-hexenal* (atrayente); sin embargo en las tratadas con limoneno (repelente) no se observó presencia de la plaga. Lo que permite aceptar la hipótesis de trabajo planteada “La aplicación de un sistema de liberación controlada de semioquímicos bajo condiciones de campo, permitirá atraer y repeler *Hylastinus obscurus*”.

La fase primera de esta investigación se basó en definir el dispositivo más eficiente para ser utilizado en terreno y la posterior etapa de implementación de un ensayo de campo permiten cumplir con el objetivo principal de esta tesis “Evaluar el efecto de *E-2-hexenal* y limoneno sobre la población de *Hylastinus obscurus*, bajo condiciones de campo”, dando respuesta a este objetivo según lo referido en párrafo anterior.

El uso del control etológico, se presenta como una gran alternativa a la hora de controlar plagas complejas, como *H. obscurus* que no han logrado ser controladas por los métodos de control tradicionales. Lo más importante es definir el mejor sistema de monitoreo

y control del insecto, ya sea atrayéndolo, repeliéndolo o disuadiendo su conducta habitual, y para ello, conocer todas las variables asociadas al sistema, y que de una u otra forma incidan en el éxito final del proceso. Por tal motivo en esta investigación previo al desarrollo de las etapas de trabajo, se plantearon los puntos que no habían sido analizados en investigaciones anteriores, así como las debilidades a la hora de controlar esta plaga, llegando a la conclusión que la forma de liberación de los compuestos así como de la mejor fuente de emisión para los mismos resulta fundamental a la hora de implementar una estrategia de control y/o monitoreo de una plaga.

7. RESUMEN

El trébol rosado es una forrajera de gran importancia en la zona centro-sur de Chile. Esta especie es afectada por huéspedes no deseados, siendo el principal de ellos *Hylastinus obscurus*. Este insecto, que vive y se alimenta al interior de las raíces del trébol rosado, no ha podido ser controlado de forma efectiva por métodos de control tradicional, provocando serios problemas en la persistencia de las praderas.

Actualmente se están investigando nuevas técnicas que permitan obtener un control efectivo que detenga o disminuya el daño que provoca este insecto. Uno de estos es el control etológico, el cual se ha masificado en los últimos años, debido a su éxito en el control y disminución de la población de diferentes especies consideradas plagas en la agricultura. Este método se basa en el uso de sustancias químicas que difunden al ambiente mediante dispensadores que las liberan en forma controlada, y que posteriormente son captadas por los órganos receptores de los insectos provocando un cambio en su comportamiento.

Estudios anteriores realizados por el Laboratorio de Ecología Química de la Universidad de La Frontera, han permitido identificar *E-2-hexenal* y limoneno que funcionan como atrayente y repelente de *H. obscurus*, respectivamente. Esto se presenta como un gran avance en la búsqueda de métodos de control hacia este insecto. Sin embargo, su forma de aplicación en terreno, y la posterior liberación de los semioquímicos identificados es el punto crítico que se presenta en esta investigación.

Para ello, se diseñó un sistema de liberación controlada de semioquímicos con el objetivo de evaluar la tasa de liberación de *E-2-hexenal* y limoneno desde tres diferentes dispensadores: septa de goma, trozo de esponja y trozo de esponja en una bolsa de polietileno. La primera parte del experimento se desarrolló en el L.E.Q. de la Universidad de La Frontera. Para ello se diseñó un sistema constituido por una cámara de cultivo con un flujo de aire en su interior con temperatura controlada. Los 3 tipos de dispensadores fueron sometidos a 6 temperaturas por 7 días. Cada 24 horas se analizó el contenido de *E-2-hexenal* o limoneno en los dispensadores mediante CG-EM. Los resultados demostraron que el dispensador que resultó retener el compuesto y liberarlo en forma más homogénea en el tiempo y a las distintas temperaturas fue la septa de goma. La segunda parte de la investigación consistió en

la implementación del experimento de campo. Se instalaron los dispensadores de septa de goma con los semioquímicos sobre parcelas de trébol rosado y de forma periódica se evaluó la población de *Hylastinus obscurus* a través de trampas pegajosas y muestreo de plantas para identificar si había o no colonización a nivel radicular.

Los resultados de esta investigación permitieron conocer la tasa de liberación de dos semioquímicos importantes para el control de *H. obscurus*. Asimismo, permitieron conocer e identificar el mejor dispensador para ser utilizado en terreno evaluando además la vida media de los compuestos en el mismo dispositivo. En las últimas etapas de dicha investigación, se encontraron insectos a nivel radicular en estado adulto y larval en las parcelas que contenían el atrayente *E*-2-hexenal. Lo contrario ocurrió con las parcelas tratadas con el repelente (limoneno), no encontrándose presencia de *H. obscurus* en ninguno de sus estadios en ninguna de las parcelas. Lo que permite inferir que el tratamiento y su forma de aplicación fueron eficaces en el control del insecto. Esta sugerencia se basa en que había presencia del barrenador en el potrero donde estaban las parcelas tratadas con semioquímicos ya que se encontraron individuos de *H. obscurus* en las trampas pegajosas, las cuales fueron instaladas para el monitoreo de la plaga.

Finalmente, se concluye que el experimento desarrollado reporta datos relevantes a la problemática que presenta este insecto para la agricultura. Proponiendo así su uso e implementación como sistema de monitoreo y control de *Hylastinus obscurus*, utilizando los semioquímicos *E*-2-hexenal como atrayente para el monitoreo de la plaga y limoneno como repelente para ser incorporados en métodos de control integrado de la misma.

8. SUMMARY

Red clover is an important forage culture in the central-southern of Chile. This species is affected by several unwanted biotics agents; the most important is *Hylastinus obscurus*. This insect, which lives and feeds inside the roots of clover, it have not been effectively controlled by traditional control methods, causing serious problems on the persistence of the prairies.

Currently there are investigations about the developing of new techniques for reducing the damage caused by this insect. One of these is the ethological control, which have increased in recent years due to its success in the control and reduction of the population of different pests for the agriculture. This method is based on the use of chemicals that diffuse to the environment from dispensers in a controlled way it being captured by the receptor organs of insects causing a change in its behavior.

Previous studies developed by the L.E.Q. of Universidad de La Frontera, have identified *E*-2-hexenal and limonene, acting as attractant and repellent towards *H. obscurus*, respectively. This is considered as a great progress in the searching for methods for controlling this insect. However, the way how to apply in the field the semiochemical and the subsequent releasing of semiochemicals from the dispenser are the critical point studied in this research.

To do this, we designed a release controlled system of semiochemicals to evaluate the release rate of *E*-2-hexenal and limonene from three different dispensers: sponge, rubber septa, and sponge in a polyethylene bag. The first part of the research was conducted at the L.E.Q. of Universidad de La Frontera. A system consisting of a growth chamber with a flow of air inside with temperature-controlled was designed. The 3 types of dispensers were subjected to 6 temperatures for 7 days. Every 24 hours, the residue in the dispenser of *E*-2-hexenal or limonene was analyzed by GC-MS. The results showed that the dispenser resulting to both retain and release the semiochemical more evenly over time and at different temperatures was the rubber septa. The second part of the research was the implementation of the field experiment. Rubber septa dispensers and the semiochemicals were installed on

clover plots and the *Hylastinus obscurus* population flying and present in red clover roots was periodically evaluated by sticky traps and plant sampling respectively.

The results of this research allowed determining the release rate of two important semiochemicals for the control of *H. obscurus*. Also, allowed to know and identify the best dispenser for being used in the field, and to evaluate the half-life of the dispenser with the compounds. In the later stages of the investigation, adult and larval insects infecting red clover roots were found in the plots containing the attractant *E*-2-hexenal. The opposite, occurred in plots treated with the repellent (limonene), where it was not found the presence of *H. obscurus* in any of its stages in any of the plots. These results suggest that the treatment and the way of the application were effective for controlling the insect. This suggestion is based on the field observation that there were insects flying in the site of the experimentation, because they were captured in sticky traps, which were installed to monitor the pest.

Finally, this research concludes that the experiment developed reports relevant data to the agriculture in relation to this insect pest. The result suggest to study the incorporation of this compounds in a system for monitoring and controlling *Hylastinus obscurus* using the semiochemicals *E*-2-hexenal as an attractant to monitor the pest and limonene as a repellent for controlling it.

9. LITERATURA CITADA

- Aguilera, A. 1989.** Ficha entomológica de La IX Región de La Araucanía. *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae). Instituto de Investigaciones Agropecuarias. IPA Carillanca (Chile) 8:2.
- Aguilera, A., E. Cisternas, M. Gerding, & H. Norambuena. 1996.** Plagas de las praderas, pp 309-339. En I. Ruiz (ed.). Praderas para Chile (2ª ed.). Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Ministerio de Agricultura, Chile.
- 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 Nutr. Veg. 10: 115-125.
- American Chemical Society. 1976.** Symposium of Pest Management with Insect Sex Attractants. Proceedings. Washington, DC. Ed. Beroza, M. (ACS Symposium Series 23).
- Audemard H., & C. Leblon, 1987.** Release rates of pheromone from Hercon vinyl plastic laminate dispensers, p. 71, En H. Am (ed.). OILB Working Group on "Use of pheromones and other semiochemicals in integrated control."
- Avé, D.A. 1995.** Stimulation of feeding insect control agents, pp. 345-363. En R.F. Chapman, & G. Boer (eds.). Regulatory mechanisms in insect feeding. Chapman & Hall.
- Baker T. C., T. Dittl, & A. Mafra-Neto. 1997.** Disruption of sex pheromone communication in the black-headed fireworm in Wisconsin cranberry marshes by using MSTRS devices. J. Agric. Entomol. 14: 449-457.
- Bakke, A. & Lie, R. 1985.** Mass trapping, pp. 67-87. En A. Jutsum & R. Gordon (eds.). Insect Pheromones in Plant Protection; Wiley; New York.
- Barrera, J., P. Montoya, & J., Rojas. 2006.** Bases para la aplicación de sistemas de trampas y atrayentes en manejo integrado de plagas, pp. 1-16. En J.F. Barrera & P. Montoya (eds.). Simposio sobre trampas y atrayentes en detección, monitoreo y control de plagas de importancia económica. Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur. Manzanillo, Colima, México.
- Bernays, E.A. 2000.** Plant-insect interactions- A synthesis. Abstr. Book I. XXI Int. Congr. Entom. Brasil. Plenary Lectures VIII-XIII.
- Bradley, S.J., D.M. Suckling, K.G. McNaughton, C.H. Wearing, y G. Karg, 1995.** A temperature-dependent model for predicting release rate rates of pheromones from a polyethylene tubing dispenser. J. Chem. Ecol. 21: 745-760.
- Bowers, W. S. 1993.** Phytochemical contributions to pest management. pp. 252-257. En R. Lumsden, & J. Vaughn (eds.). Pest management: Biologically based technologies. Beltsville Symposium XVIII, Agric. Res. Service. U.S. Dep. Agric. Maryland.
- Brust, G.E., & R.E. Foster. 1995.** Semiochemical-based toxic baits for control of striped cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in cantaloupe. J. Econ. Entom. 88:112-116.

- Campion, D. G.; B. R. Critchley, & L. J. McVeigh, 1985.** Mating disruption pp. 89-119. En A. Jutsum & R. Gordon (eds.). *Insect Pheromones in Plant Protection*; Wiley; New York, 1985; pp 89-119.
- Charmillot, P. J., & D. Pasquier, 1993.** Un nouveau diffuseur homologue pour la lutte par confusion en verger. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 25:123-128.
- Cisternas, A., & M. Norambuena. 1991.** Plagas insectiles, pp. 35-44. En A. Torres & J.C. Dumont (eds.). *Producción y utilización de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.)*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Remehue N° 13, Osorno, Chile.
- Copping, L. 2001.** The crop-protection industry. *Chem. Ind.* 20: 500–501.
- Darlane, B., & F. Morrison. 1957.** The distribution and importance of the clover root borer (*Hylastinus obscurus* Marsham) (Coleoptera: Scolytidae) in Quebec. *Canadian J. of Plant Sci.* 37: 26-33.
- Flores, S. 2003.** Bases del trampeo y atrayentes, pp. 89-98. *En XV Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta*. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Metapa de Domínguez, Chiapas, México.
- Frazier, J. L., & S. Chyb. 1995.** Use of feeding inhibitors in insect control. pp. 364-381. *En Regulatory mechanisms in insect feeding*. Chapman & Hall, Inc. New York.
- Hall, F.R., & J.J. Menn. 1999.** Biopesticides: Use and delivery. Human Press. New Jersey, 626p.
- Haynes, K., & T. Baker. 1988.** Potential for evolution of resistance to pheromones. *J. Chem. Ecol.* 14: 1547- 560.
- Ioriatti, C., & A. Dalla Serra, 1992.** Five-year experience with mating disruption as a control method against codling moth and leafroller species in apple orchards of Trentino, pp. 88-93 En C. Ioriatti and H. Am (eds.). *OILB Working Group on "Use of pheromones and other semiochemicals in integrated control."*
- Koehler, C., G. Gyrisco, L. Newsom, & H. Shwart. 1961.** Biology and control of the clover borer, *Hylastinus obscurus* (Marsham). *Memoir Cornell. Agriculture Experiment Station* N° 376. 36 p.
- Kogan, M. 1998.** Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 243–270.
- Law, R. H., & F. E. Regnier. 1971.** Pheromones. *Annu. Rev. Biochem.* 40: 533-548.
- Lee, B., W. Choi, S. Lee, & B. Park, 2001.** Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) *Crop Protection* 20: 317-320.
- Macías-Samano, J., J. Borden, R. Gries, H. Pierce, G. Gries, & G. King, 1998.** Primary attraction of the fir engraver, *Scolytus ventralis*. *J. Chem. Ecol.* 24 (6): 1049- 1075.

- Mafra-Neto A. & T. C. Baker. 1996.** Timed, metered sprays of pheromone disrupt mating of *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Agric. Entomol. 13: 149-168.
- Mareggiani G. 2001.** Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. Manejo Integrado de Plagas. 60: 22-30.
- Matamala, J. 1976.** Biología, niveles de infestación, daño y combate químico de *Hylastinus obscurus* (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 38p.
- Mayer, M.S. & Mitchell, E.R. 1998.** Rapid Measure of Sex Pheromone Emission from Plastic Rope Dispensers: Example of Utility in Sexual Communication Disruption of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. Phytoparasitica 26: 117-125
- Metcalf, R. L., & E. R., Metcalf. 1992a.** Plant kairomones in insect ecology and control. London, Chapman & Hall. 168p.
- Metcalf, R. L., & E. R. Metcalf. 1992b.** Atrayentes, Repelentes y Control Genético en el Manejo de Plagas, pp. 345-388. En Introducción al manejo de plagas de insectos. R. Metcalf & W. Luckmann (eds.). Editorial Limusa, México.
- Minks, A. K. 1977.** Trapping with behavior-modifying chemicals: feasibility and limitations, pp. 385-394. En H. Shorey & J.J. Jr. Mckelvy (eds.). Chemical Control of Insect Behavior, John Wiley and Sons. New York, U.S.
- Mitchel, R.E. 1981.** Management of insect pests with semiochemicals. Concepts and practice. US Department of Agriculture. Fla, USA. Plenum Press. New York, USA, 514p.
- Montoya, P., H. Celedonio, H. Miranda, J. Paxtian, & D. Orozco. 2002.** Evaluación de sistemas de trampeo y atrayentes para la captura de hembras de *Ceratitis capitata* (Wied.) y otras moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en la región del Soconusco, Chiapas. Folia Entomol. Mex. 41: 359-374.
- Muirhead-Thomson, R. C. 1991.** Trap Responses of Flying insects. Academic Press, San Diego, Ca, 287 p.
- Neumann, O. 1992.** Avoiding pitfalls in confusion: A review on mating disruption, pp. 10-17 En C. Ioratti & H. Am (eds.). OILB Working Group on "Use of pheromones and other semiochemicals in integrated control."
- Nordlund, D. A. 1981.** Semiochemicals: a review of terminology, pp. 13-28. En D.A. Nordlund, Jones, R. L., Lewis, W. J., (eds.). En Semiochemicals, Their Role in Pest Control; Wiley, New York.
- Obeng-Ofori, D. 1993.** Behavioural responses of three stored product Coleoptera species to extract of carob (Locust bean), *Ceratonia siliqua*. Entomol. Exp. Appl. 68: 9-13.
- Oehlschaler, A. C., C. M. Chinchilla, L. M. Gonzalez, L. F. Jiron, R. Mexzon, & B. Morgan. 1993.** Development of a pheromone-based trapping system for *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 86: 1381-1392.

Ogawa, K. 1997. The key to success in mating disruption. Technology Transfer in Mating disruption. IOCB wprs Bulletin 20: 1-9.

Parra, L. 2009. Factores biológicos y químicos asociados en la interacción entre *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae) y su hospedero *Vaccinium corymbosum* L. Tesis de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Pedigo, L. 1996. Management by modifying insect development and behavior, pp. 461- 478. *En* Entomology and Pest Management. Academic Press. New York. USA. 987 p.

Pimentel, D. 1991. Pesticides and world food supply. Chemistry in Britain 27: 646-647.

Prokopy, R., P. Phelan, S. Wright, A. Minalga, R. Barger & T. Leskey, 2001. Compounds from host fruit odor attractive to adult plum curculios (Coleoptera: Curculionidae). J. Entomol. Sci. 36:122-134.

Pruess, K., & C. Weaver. 1958. Estimation of red clover yield losses caused by the clover root borer. J. Econ. Entomol 51: 491-492.

Pureswara D, R. Gries, & J. Borden, 2004. Quantitative variation in monoterpenes in four species of conifers. Biochemical Systematics and Ecology 32: 1109–1136.

Quiroz, A., F. Ortega, C. Ramirez, L. J. Wadhams, and 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.

Ridgway, R.L., R.M. Silverstein, & M.N. Inscoe. 1990. Behavior-modifying chemicals for insect management. Marcel Dekker, Inc. New York. 761p.

Rodriguez, L., & H. Niemeyer. 2005. Integrated pest management, semiochemicals and microbial pest-control agents in Latin American agriculture. Crop Prot. 24: 615-623.

Ruther, J., A. Reinecke; K. Thiemann; T. Tolasch; W. Francke, & M. Hilker. 2000. Mate finding in the forests cockchafer, *Melolontha hippocastani*, mediated by volatiles from plants and females. Physiol. Entomol. 25: 172-179.

Schoonhoven, L. M., T. Jermy, & J.J.A. van Loon. 1998. Insect-plant biology: from physiology to evolution. Chapman and Hall, London, United Kingdom.

Stadler, E. 2002. Plant chemical cues important for egg deposition by herbivorous insect, pp. 171-204. *In* M. Hilker & T. Meiners (eds.). Chemoecology of insect egg and egg deposition. Blackwell Publishing. Berlin.

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) (Coleoptera: Scolytidae) to them. Biochem. Syst. Ecol. 35: 61-67.

Tripathi, A., V. Prajapati, S. Khanuja, & S. Kumar, 2003. Effect of d-Limonene on Three Stored-Product Beetles. J. Econ. Entomol. 96: 990-995.

Visser, J., S. Straten, & H. Maarse, 1979. Isolation and identification of volatiles in the foliage of potato, *Solanum tuberosum*, a host plant of the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. J. Chem. Ecol. 5:13-25.

Vrkocova, P., I. Valterova, J. Vrkoc & B. Koutek, 2000. Volatiles released from oak, a host tree for the bark beetle *Scolytus intricatus*. Biochem. Syst. Ecol. 28: 933-947.

Wall, C. 1985. Monitoring and spray timing, pp. 39-66. En A. Jutsum & R. Gordon (eds.). Insect Pheromones in Plant Protection; Jutsum, A. R., Gordon, R. F. S., Eds.; Wiley: New York, 1985; pp 39-66.

Warthen, J. D., E. D. Morgan. 1990. Insect feeding deterrents. In E. D. Morgan & N. V. Mandava (eds.). CRC Handbook of natural pesticides. Insect attractants and repellents. Florida, CRC Press. p 23-134.

Warthen, J.D., R.T. Cunningham, B.A. Leonhardt, J.M. Cook, J.W. Avery, & E. M. Harte. 1998a. Comparison of ceralure and trimedlure controlled release formulations for male mediterranean fruit flies in C&C traps. J. Chem. Ecol. 24: 1305-1314.

Warthen, J.D., E.R. Mitchell, & E.M. Harte. 1998b. Laboratory release rate studies of Shin-Etsu, freshly manufactured versus cold-stored, fresh pheromone ropes. J. Environ. Sci. Health, Part A 33: 701-714.

Weatherstone, I. 1990. Principles of design of controlled-release formulations, pp. 93-112. En Ridgway, R. M. Silverstein; M. N. Inscoe (eds.). Behavior Modifying Chemicals for Insect Management;

Yosha, I., A. Shani, & S. Magdassi, 2008. Slow release of pheromones to the atmosphere from gelatin-alginate beads. J. Agric. Food Chem. 56: 8045–8049.

Zhang, A. 2005. Laboratory evaluation of semiochemical dispensers: a theoretical chemical kinetic approach to the emission rate of disparlure active ingredient. Proceedings, 16th U.S. Department of Agriculture interagency research forum on gypsy moth and other invasive species. pp. 93-95.

10. AGRADECIMIENTOS

La autora de esta investigación agradece el apoyo y financiamiento al Laboratorio de Ecología Química-UFRO y Proyecto FONDECYT N° 1100812.

Al profesor tutor de tesis Andrés Quiroz por su apoyo, confianza, consejos, y sobre todo por la oportunidad de poder pertenecer a este equipo de trabajo y al desarrollo de esta investigación.

Al grupo de personas que componen el Laboratorio de Ecología Química A Leo, Loreto, Ayill, Marcelo, Rubén, Anita, Karen, Betania y a de personas que de una u otra forma permitieron con su apoyo poder desarrollar y terminar esta tesis.

A mi familia Pedro, Magdalena y Martin por su amor, paciencia y apoyo incondicional, y por ser las personas mas importantes de mi vida, sin ustedes, no hubiese terminado esta tesis.

A mis amigos y compañeros de carrera Dani, Juan Pablo, Claudia, Susi y los “Rodolfos” Lubascher, Buck y Mittersteiner, por todos los buenos momentos vividos.

Muchas Gracias a todos.

.

