



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Evaluación de feromonas sexuales para el control de tortricidos nativos (Lepidoptera: Tortricidae) en frutales de pepita

Valentina MARTÍNEZ SBAJ

Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

Setiembre 2021

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. Dra. María Valentina Mujica (Presidente), Lic. PhD. Miryan Coracini (Vocal) y Lic. Dra. Paula Altesor (Vocal), el 23 de Setiembre de 2021.

Autora: Ing. Agr. Valentina Martínez Sabaj.

Director: Dr. Andrés González Ritzel.

Co-directora: Ing. Agr. Iris Beatriz Scatoni.

AGRADECIMIENTOS

A mi director Andrés González por la orientación brindada y a Viviana Haguaburu por ser la creadora de este proyecto.

A Beatriz Scatoni por abrirme las puertas de la Entomología, acompañarme en todo momento y principalmente por confiar en mí.

A Alejandra Borges por la orientación en Estadística.

A mis compañeros de la Cátedra de Entomología por apoyarme siempre que lo necesité y por el valioso tiempo compartido.

A Shin-Etsu Chemical Company y especialmente a Naoki Ishibashi, Takeshi Kinsho, Tatuya Fujii y Toshi Nojima, por proveer las partidas experimentales de los emisores de feromonas evaluados.

A la cooperativa JUMECAL por apoyar el proyecto, y en especial a Catherine Espina y Exequiel Trezza.

A los productores Adriana Zumarán, Martín Birriel y Alejandro Calcetto por permitirnos trabajar desinteresadamente en sus predios.

A INIA y ANII por la financiación recibida.

A Victoria Calvo, Soledad Delgado, Guillermo Katzenstein, Nicolás Yakimik, Angelo Turra, Álvaro García, Paula Altesor, Diana Valle, Carolina Sosa, Guillermo Rehermann, Gualberto Bottini, Diego Llona, Katerine Rasquin y Santiago Cocco por ayudarme con la colocación de los emisores.

A mi familia y a Martín.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. PRODUCCIÓN DE FRUTALES DE PEPITA EN URUGUAY	1
1.2. PRINCIPALES PLAGAS DEL CULTIVO DEL MANZANO Y SU MANEJO	2
1.2.1. <u>Manejo de <i>Cydia pomonella</i> (Linnaeus, 1758) y <i>Grapholita</i> <u><i>molesta</i> (Busck, 1916) en Uruguay</u></u>	3
1.2. <u><i>Argyrotaenia sphaleropa</i> (Meyrick, 1909) y <i>Bonagota</i> <u><i>salubricola</i> (Meyrick, 1937)</u></u>	5
1.2.2.1. Descripción.....	5
1.2.2.2. Origen, distribución y hospederos	7
1.2.2.3. Ciclo estacional	8
1.2.2.4. Daños e importancia económica	9
1.2.2.5. Manejo de ambas plagas	12
1.3. FEROMONAS SEXUALES DE LEPIDÓPTEROS.....	12
1.3.1. <u>Aplicación de las feromonas sexuales de lepidópteros</u>	13
1.3.1.1. Detección y monitoreo.....	14
1.3.1.2. Técnica de confusión sexual y su aplicación en plagas del manzano	15
1.3.1.3. Feromonas sexuales de <i>Argyrotaenia sphaleropa</i> y <u><i>Bonagota salubricola</i></u>	19
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	22
2.1. SITIOS DE ESTUDIO Y APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS ...	22

2.1.1. <u>Aplicación de la confusión sexual</u>	25
2.1.2. <u>Manejo de plagas en las parcelas experimentales</u>	27
2.2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA CONFUSIÓN SEXUAL	28
2.2.1. <u>Monitoreo de adultos</u>	28
2.2.2. <u>Evaluación de daños</u>	32
2.2.3. <u>Apareamiento de adultos en jaulas</u>	33
2.2.4. <u>Evaluación de la tasa de liberación de las feromonas en condiciones de campo</u>	36
3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	39
3.1. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA CONFUSIÓN SEXUAL	39
3.1.1. <u>Monitoreo de adultos</u>	39
3.1.2. <u>Evaluación de daños</u>	44
3.1.3. <u>Apareamiento de adultos en jaulas</u>	48
3.1.4. <u>Evaluación de la difusión de la feromona en campo</u>	49
4. <u>CONCLUSIONES</u>	56
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	57
6. <u>ANEXOS</u>	66
6.1. <u>MATERIAL SUPLEMENTARIO</u>	66
6.2. <u>MATING DISRUPTION OF NATIVE LEAFROLLERS IN APPLE ORCHARDS UNDER AREA-WIDE PEST MANAGEMENT OF CODLING MOTH AND ORIENTAL FRUIT MOTH</u>	68

RESUMEN

Las lagartijas de los frutales, *Argyrotaenia spheropa* y *Bonagota salubricola* (Lepidoptera: Tortricidae), se han convertido en importantes plagas de los frutales de pepita. Es posible reemplazar el manejo actual basado en insecticidas, por alternativas de bajo impacto ambiental, como la técnica de confusión sexual, tomando como referencia su exitosa implementación en Uruguay para *Cydia pomonella* y *Grapholita molesta*. Se evaluaron dos tratamientos, confusión sexual y control convencional, en parcelas de 4ha cada uno, en tres predios con montes de manzanos y durante dos temporadas. En las parcelas con confusión sexual se instalaron 500 emisores experimentales de feromona/ha de cada especie a principios de noviembre. La eficacia se evaluó mediante el registro de capturas de machos adultos en trampas de feromonas, la evaluación de daños en frutos y la determinación de las tasas de apareamiento de adultos en jaulas. Para establecer la durabilidad de los emisores, se determinaron por gravimetría las tasas de liberación de ambas feromonas en condiciones de campo. Como resultado de la aplicación de confusión sexual se produjo un completo silenciamiento de las trampas de monitoreo. No se obtuvieron diferencias significativas en relación al porcentaje de daño en frutos entre los tratamientos. La tasa de apareamiento de *A. spheropa*, medida a través de la puesta de huevos viables, fue significativamente menor en la parcela de confusión sexual en relación al control. Los emisores de feromona para ambas especies duran toda la temporada productiva, con niveles sostenidos de emisión, no siendo necesario su reemplazo. El estudio demuestra que la técnica de confusión sexual obtuvo resultados de control comparables al uso de insecticidas, con la ventaja de no tener efectos nocivos sobre la salud humana y el ambiente.

Palabras clave: *Argyrotaenia spheropa*, *Bonagota salubricola*, feromonas, confusión sexual, frutales de hoja caduca

Evaluation of sex pheromones for the control of native tortricids (Lepidoptera: Tortricidae) in pome fruit trees

SUMMARY

The native leafrollers, *Argyrotaenia sphaleropa* and *Bonagota salubricola* (Lepidoptera: Tortricidae), have become important pests of pome fruit trees. It is possible to replace the current insecticide-based management with alternatives with low environmental impact, such as the mating disruption technique, taking as a reference its successful implementation in Uruguay for *Cydia pomonella* and *Grapholita molesta*. Two treatments, mating disruption and conventional control, were evaluated in plots of 4ha each, in three plots with apple trees and during two seasons. In the plots with mating disruption, 500 experimental pheromone dispensers / ha of each species were installed at the beginning of November. Efficacy was evaluated by recording adult male captures in pheromone traps, evaluating fruit damage, and determining adult mating rates in cages. To establish the durability of the dispensers, the release rates of both pheromones were determined under field conditions. As a result of the application of mating disruption there was a complete shutdown of the monitoring traps. No significant differences were obtained in the percentage of damage in fruits between the treatments. The mating rate of *A. sphaleropa*, measured through the laying of viable eggs, was significantly lower in the mating disruption plot in relation to the control. The pheromone dispensers for both species last throughout the productive season, with sustained levels of emission, not requiring their replacement. The study shows that the mating disruption technique obtained control results comparable to the use of insecticides, with the advantage of not having harmful effects on human health and the environment.

Keywords: *Argyrotaenia sphaleropa*, *Bonagota salubricola*, pheromones, mating disruption, deciduous fruit trees

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRODUCCIÓN DE FRUTALES DE PEPITA EN URUGUAY

En Uruguay la producción de frutales de hoja caduca ocupa una superficie de 5400 hectáreas, de las cuales 3400 están dedicadas al cultivo de frutales de pepita, principalmente manzano y peral (DIEA, 2019). El cultivo de manzano es quien ocupa la mayor superficie con 2.677 hectáreas en producción, representando casi el 50% de la superficie total. La producción se concentra principalmente en la zona sur del país, en los departamentos de Montevideo, Canelones, San José y Colonia (DIEA, 2018).

De un total de 747 productores de frutales de hoja caduca existentes al año 2016, 472 tienen plantaciones de manzanos (DIEA, 2016). Las variedades más plantadas en Uruguay pertenecen en su mayoría al grupo de las manzanas rojas, siendo Red Chief, Red Delicious y Early Red One las principales, con el 44% de la superficie. Con el 16% le sigue el grupo de las bicolors, considerando Cripp's Pink, Royal Gala y Fuji, y en menor proporción las manzanas verdes representado por la variedad Granny Smith con un 12% (DIEA, 2018).

Para la temporada 2015-2016, la producción total de manzanas en el país fue de 37.675 toneladas, teniendo como principales destinos el mercado de frutas frescas (84.6%), la industria (11.1%) y la exportación (4.1%) (DIEA, 2018). El 46% del Valor Bruto de Producción (VBP) del total de las especies caducas corresponde a lo aportado por la producción de manzanos (DIEA, 2012).

Un aspecto característico de la fruticultura uruguaya es que se desarrolla en predios relativamente pequeños, predominando la producción familiar, donde coexisten diversas especies y variedades de frutales. El 42% de la producción de manzanos y el 50% de la producción de perales se

encuentra en parcelas menores a 10 ha, lo que hace muy complejo el manejo de algunas plagas (Scatoni et al., 2011). Debido a que estos frutos son destinados principalmente al consumo en fresco, su calidad cosmética adquiere especial relevancia, tornándose inevitable el descarte comercial de aquellos que presenten daños o defectos, pudiendo esto traducirse en grandes pérdidas económicas para los productores.

Considerando la importancia que tienen los cultivos de pepita en la fruticultura nacional, es vasto el interés por parte del sector en adoptar medidas de control efectivas para aquellas plagas que afecten directamente el rendimiento de sus cosechas.

1.2. MANEJO DE PLAGAS EN EL CULTIVO DE MANZANO

El control químico ha sido la estrategia más comúnmente utilizada para el control de plagas en frutales. Sin embargo, las consecuencias ocasionadas por el uso desmedido de insecticidas han promovido el desarrollo y la implementación del Manejo Integrado de Plagas (MIP) que da uso a múltiples tácticas para su control, fundamentadas en el conocimiento de la biología y ecología de las plagas y los factores que influyen sobre ellas. Las herramientas fundamentales del MIP son la monitorización, que permite conocer el nivel poblacional de la plaga y para la cual se utilizan principalmente trampas atrayentes, y el pronóstico, que predice la velocidad de desarrollo de la plaga mediante modelos fenológicos en base a grados día (Núñez et al., 1998).

A nivel mundial la utilización de métodos alternativos de control, como la técnica de confusión sexual, ha permitido disminuir significativamente la incidencia de las dos plagas más importantes de la fruticultura, los tortricidos *Cydia pomonella* (carpocapsa) y *Grapholita molesta* (grafolita).

1.2.1. Manejo de *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) y *Grapholita molesta* (Busck, 1916) en Uruguay

En nuestro país estas plagas eran controladas únicamente mediante la aplicación de insecticidas. En el año 2006 se dieron una serie de dificultades en la exportación de manzanas y peras a Brasil por detectarse en inspecciones fitosanitarias en frontera la presencia de larvas vivas de lepidópteros en el interior de los frutos. Debido a que *Cydia pomonella* es plaga cuarentenaria para Brasil, y amparados en la legislación brasilera, el encontrar una larva viva, independientemente de la especie que se tratara, significaba el rechazo de la partida de frutas. Por su parte, el mercado europeo ya estaba adoptando una política restrictiva en cuanto a los límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas permitidos en la fruta importada (Núñez et al., 2012).

A partir de esta situación de los mercados se puso en marcha la validación de un protocolo de Manejo Integrado de Plagas (MIP) que permitiera producir fruta de exportación libre de carpocapsa y con un uso racional de insecticidas. El Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) entre el 2006-2008 inicia un proceso de ajuste de la técnica de confusión sexual para el control de carpocapsa y grafolita a nivel predial. Luego entre el 2008 y 2010 se inicia un periodo de validación del protocolo establecido para ser aplicado en áreas amplias, primero en módulos de 50 ha y finalmente entre 2010 y 2013 se alcanzan las 300 ha en la localidad de Melilla; realizado en el marco de un proyecto para la aplicación de nuevas tecnologías financiado por ANII y en un acuerdo interinstitucional entre INIA, Facultad de Agronomía y la Cooperativa JUMECAL.

En 2012 ocurre nuevamente el cierre de la frontera brasilera a las exportaciones de fruta uruguaya por la presencia de larvas de lepidópteros. En este contexto, dados los excelentes resultados que se estaban obteniendo en el módulo de validación en Melilla, surge el interés por parte

de la Dirección General de la Granja (DIGEGRA-MGAP) de extender esta experiencia a toda el área de producción de frutales de hoja caduca del sur del país.

Para levantar las restricciones impuestas tanto por los países europeos como por Brasil fue que se establecieron medidas sanitarias a través de la implementación del Programa Interinstitucional de Manejo Regional de Plagas (DIGEGRA, DGSA, FAGRO e INIA). El programa tuvo como objetivos disminuir las poblaciones de carpocapsa y grafolita, reducir las aplicaciones de insecticidas y como consecuencia recuperar los mercados de exportación. El Programa fue creciendo y en la actualidad comprende unas 3700 ha correspondientes al 95% del área frutícola del país, compuesta por aproximadamente 410 productores. Con la implementación de esta técnica se alcanzaron daños menores al 0,5% además de lograrse la reducción sostenida de casi un 50% en el número de aplicaciones de insecticidas. Se incentivó el uso de insecticidas con ingredientes activos más selectivos, lográndose la disminución del uso de organofosforados y el incremento de insecticidas reguladores del crecimiento de insectos (Zoppolo et al., 2016). De esta forma no solo se mejora la inocuidad de los productos sino que también se reduce el impacto negativo sobre el ambiente y la salud de los trabajadores rurales.

Sin embargo, la aplicación del control específico de estas plagas en programas de área extensa, mediante utilización de feromonas de confusión sexual y en simultáneo con la reducción del uso de insecticidas de amplio espectro, resultó en el aumento de la incidencia de otras plagas. Especies que hasta el momento eran consideradas plagas secundarias se volvieron de gran relevancia para los frutales de pepita. Este fue el caso particular de las especies nativas *Argyrotaenia spheropa* (Meyrick, 1909) y *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937), conocidas como lagartitas de los racimos y de los frutales respectivamente. Su importancia radica en que causan daños directos sobre el producto comercial desvalorizándolo completamente.

1.2.2. *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick, 1909) y *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937)

1.2.2.1. Descripción

Los tortricídeos (Lepidoptera: Tortricidae) son una familia de insectos que comprende unas 8000 especies ampliamente distribuidas. Representan uno de los grupos de lepidópteros de mayor importancia económica tanto por el número de especies dañinas como por la gravedad de los perjuicios que ocasionan (Bentancourt y Scatoni, 2010). En Uruguay la familia tiene fundamental importancia ya que en su mayoría son plagas de primer orden. Los mayores perjuicios se dan en el área de la fruticultura donde la incidencia de algunos de sus miembros genera anualmente graves daños exigiendo la adopción permanente de medidas de control (Bentancourt y Scatoni, 2006).

Se caracterizan por ser polillas pequeñas de coloración variada, con alas anteriores uniformes o profusamente dibujadas. Presentan cabeza con escamado áspero, antenas filiformes y epífisis tibiales con fórmula de espolones tibiales 0-2-4. Los adultos en su mayoría tienen hábitos crepusculares y nocturnos, permaneciendo resguardados en el follaje durante el día. Las larvas se alimentan de diversas estructuras de las plantas barrenando yemas, tallos, frutos, semillas y raíces, llevando generalmente una vida oculta. Los tortricídeos pupan en aquellas partes de las plantas previamente atacadas por las larvas, debajo de la corteza o en el suelo. *Argyrotaenia sphaleropa* y *B. salubricola* pertenecen a la subfamilia Tortricinae, que incluye parte de las especies más comunes de la familia, entre ellas un gran número de larvas enrolladoras de hojas (Bentancourt et al., 2009).

Como características principales, *A. sphaleropa* presenta diferenciación de tamaño entre sexos, siendo la hembra adulta de mayor tamaño que el macho con 15 mm de expansión alar y 12 mm respectivamente. Las alas

anteriores son de color castaño claro a castaño oscuro casi negro, aunque la coloración puede variar entre individuos. Un detalle particular de esta especie es que sobre el margen posterior del ala se observa un diseño triangular que cuando la polilla está en posición de reposo forma un rombo en el dorso, siendo esto más notorio en la hembra (Figura 1A). Por su parte, el adulto de *B. salubricola* mide de 11 a 14 mm de expansión alar. Las alas anteriores presentan en su parte basal tonos claros y oscuros resultantes de la disposición irregular de escamas negras, castaño rojizas y gris claro (Figura 1B) (Bentancourt y Scatoni 2006, Núñez y Scatoni 2013).

Las puestas de ambas especies son realizadas, por lo general, en el haz de las hojas de las plantas de las cuales se alimentan. Los adultos de ambas especies depositan sus huevos ligeramente superpuestos en masas irregulares (Figura 1C, D). Las puestas se diferencian en que en *B. salubricola* la masa de huevos está cubierta por una sustancia blanquecina que se extiende por fuera de la misma formando un halo a su alrededor (Figura 1D) (Bentancourt y Scatoni 2006, Núñez y Scatoni 2013).

Las larvas de una misma puesta emergen de manera conjunta, transcurren por cinco o seis estadios, y en una primera etapa se alimentan del follaje para luego trasladarse a los frutos. Las larvas de ambas especies son de coloración verde (Figura 1E, F) y se diferencian únicamente en dos momentos, cuando la larva de primer estadio de *B. salubricola* presenta la cápsula cefálica negra y *A. sphaleropa* de color castaño claro, y durante el cuarto y quinto estadio larval cuando *B. salubricola* desarrolla dos líneas dorso-laterales blanquecinas a lo largo del cuerpo (Figura 1F) (Bentancourt y Scatoni, 2002). Las pupas miden de 6 a 8 mm de longitud y, por lo general, se encuentran envueltas por un capullo sedoso en el interior de hojas plegadas o entre los frutos (Núñez y Scatoni, 2013).

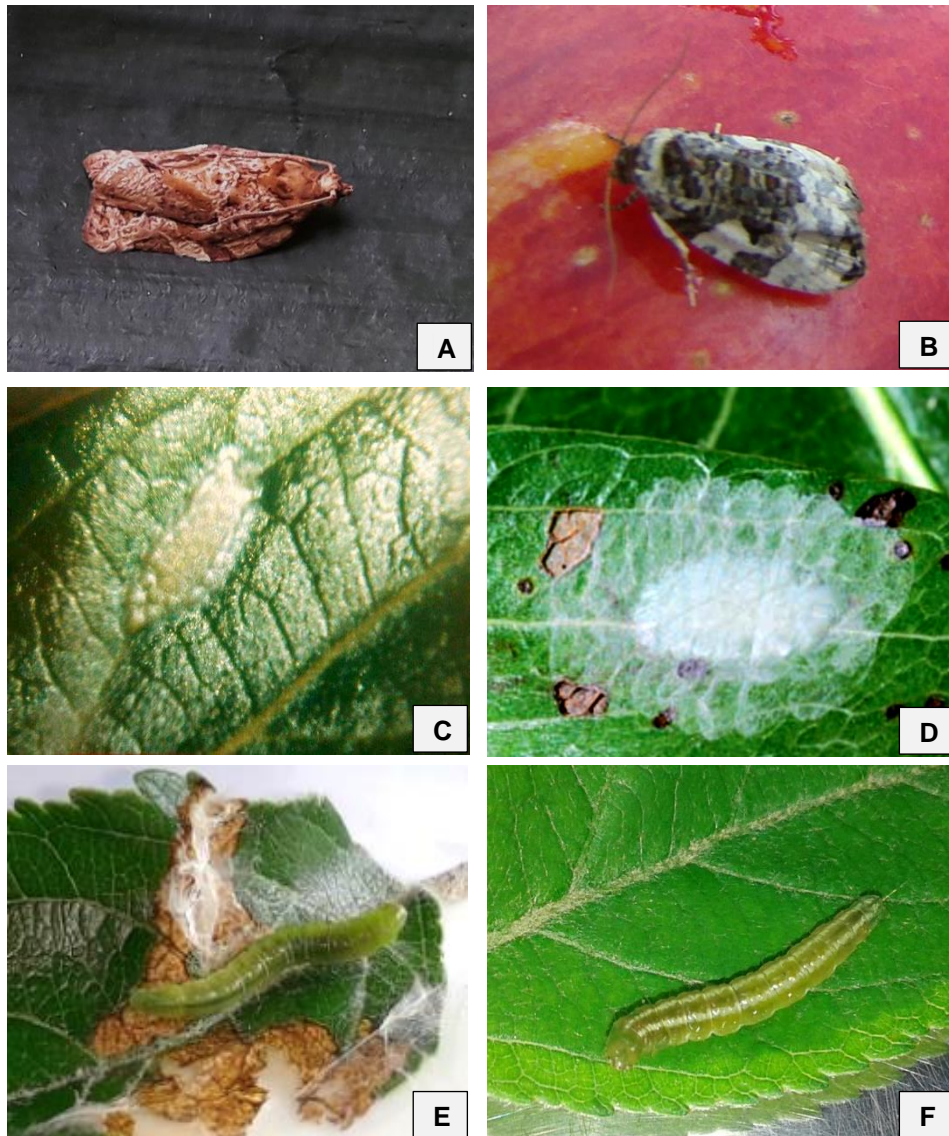


Figura 1. Adultos, puestas y larvas de último estadio de *Argyrotaenia spheropa* (A, C y E) y de *Bonagota salubricola* (B, D y F)

1.2.2.2. Origen, distribución y hospederos

Argyrotaenia spheropa fue descrita por primera vez en 1909 como *Tortrix spheropa* Meyrick (Bentancourt y Scatoni 1986, Manfredi-Coimbra et al. 2001) y citada por primera vez en Uruguay como *Eulia spheropa* (Meyrick) por Ruffinelli y Carbonell en 1953 quienes la señalaron como plaga

del manzano. Por su parte, *B. salubricola* fue citada por primera vez para nuestro país por Biezanko y colaboradores en 1957 (Bentancourt y Scatoni 2006, Núñez y Scatoni 2013).

Ambas especies son nativas del sur de América del Sur y su distribución actualmente está restringida a la región. *Argyrotaenia sphaleropa* se encuentra presente en Argentina, Bolivia, Brasil al sur de San Pablo, Perú y Uruguay (Núñez et al. 2002, Bentancourt y Scatoni 2006, Núñez y Scatoni 2013), mientras que *B. salubricola* se encuentra en Argentina, sur de Brasil y Uruguay (Bentancourt y Scatoni 2006, Bentancourt y Scatoni 2010, Núñez y Scatoni 2013). En Uruguay se encuentran comúnmente en Montevideo, Canelones, San José y en menor abundancia en otros departamentos del país (Bentancourt y Scatoni, 2002).

Estos tottrícidos autóctonos son notablemente polífagos teniendo como hospederos una gran cantidad de especies vegetales perennes y caducifolias. Suelen encontrarse en diversas especies de frutales, plantas ornamentales de parques y jardines y en especies herbáceas y malezas (Bentancourt y Scatoni 2002, Núñez y Scatoni 2013).

Ambas especies se han encontrado alimentándose de frutales como manzano, peral, ciruelo, duraznero, vid y cítricos (Bentancourt y Scatoni 2006, Morandi-Filho et al. 2007, Meneguim y Hohmann 2007). Además tienen otros hospederos secundarios como el ceibo, jazmín, ligustro, madreSelva, rosal, vinca y *A. sphaleropa* además fue reportada en caqui (Manfredi-Coimbra et al. 2001, Morandi-Filho et. al 2007), algodón (Herrera, 2011) espina de la cruz, laurel, ligustrino, dalia, pimiento y rosa de la china (Bentancourt y Scatoni 2006).

1.2.2.3. Ciclo estacional

En la zona sur del país *A. sphaleropa* y *B. salubricola* presentan cuatro y cinco generaciones anuales, respectivamente, las cuales se suceden ininterrumpidamente a lo largo del año debido a que no poseen diapausa.

Los grados días requeridos para completar el ciclo total de desarrollo para *A. sphaeropa* es de 473,3 GD con un umbral inferior de 11°C, y en inviernos benévolos puede sucederse una quinta generación (Manfredi-Coimbra et al. 2001). A su vez *B. salubricola* requiere 745 GD con un umbral inferior de 6,8 °C que le alcanza para completar anualmente la quinta generación que permanece activa durante el invierno (Botton et al., 2000). Su polifagia les permite desarrollarse sobre diversos hospederos y desplazarse de los hospederos perennes a los frutales caducifolios a medida que transcurren las generaciones.

Las larvas de la primera generación de *A. sphaeropa* y *B. salubricola* se desarrollan durante la primavera sobre diversas plantas, pero pocas veces se presentan sobre cultivos, por lo cual sus daños son de escasa relevancia. Los adultos de esta generación vuelan durante diciembre generando las larvas de la segunda generación. En manzano, el período crítico de ataque en fruta se registra en la primera quincena de enero. Posiblemente las larvas causantes de estos daños provienen de las puestas de los adultos que vuelan en diciembre y cuyas larvas en los primeros estadios se alimentaron de hojas. Las larvas de la tercera generación que se desarrollan principalmente durante febrero y marzo, suelen ser las que ocasionan los mayores daños, correspondiéndose con los meses de cosecha de la uva, la pera y la manzana. Las larvas de la cuarta generación permanecen activas sobre plantas perennes como madreselva, jazmín y ligustro entre otros hospederos alternativos. Exceptuando en los meses de invierno, los períodos de vuelo de ambas especies son coincidentes durante el resto del año (Bentancourt y Scatoni 2006, Bentancourt y Scatoni 2010, Núñez y Scatoni 2013).

1.2.2.4. Daños e importancia económica

Argyrotaenia sphaeropa y *B. salubricola* fueron históricamente consideradas plagas secundarias de la fruticultura bajo manejo

convencional, cuando la aplicación de insecticidas de amplio espectro dirigidos a las principales plagas *Cydia pomonella* y *Grapholita molesta* también las controlaban. El uso de confusión sexual a nivel predial fomentada por el Programa de Producción Integrada provocó el paulatino incremento de estas plagas.

Ambas especies producen daños similares, no diferenciables, aunque su incidencia económica ha sido reportada en períodos distintos. *A. sphaeropa* se ha vuelto habitual en manzanos desde su primera mención en 1953, y a partir de la década del 70 también en vid, mientras que *B. salubricola* ha sido relevante desde la década del 80. La intensidad de sus daños varía entre años y entre localidades. Cuando las densidades poblacionales son elevadas, los perjuicios alcanzan particular severidad, principalmente en los cultivos de manzano, peral y vid causando como consecuencia grandes pérdidas económicas (Bentancourt y Scatoni, 2006).

En manzano, las larvas pequeñas se ubican en los brotes en activo crecimiento alimentándose del limbo de las hojas. A medida que crecen perforan las mismas y las unen con hilos de seda para su protección. Estos daños son fácilmente visibles, pero sin embargo resultan de escasa importancia (Figura 2A, B). El problema comienza posteriormente cuando se desplazan a los frutos, alojándose en la cavidad peduncular o en la unión de dos frutos o de un fruto y una hoja. Este hábito críptico les sirve de protección, entre otras cosas, frente a la aplicación de insecticidas dificultando su acción (Núñez y Scatoni, 2013). Las larvas, que nunca penetran el fruto, se alimentan superficialmente de los mismos causando lesiones de contorno irregular, quitándoles valor comercial (Figura 2C, D).

En vid se desarrollan tanto en hojas como en racimos, pero muestran una marcada predilección por estos últimos. Al alimentarse directamente de las bayas desmerecen completamente la calidad de los mismos. Estos ataques adquieren mayor importancia luego del envero donde sus daños

representan una vía de entrada para patógenos causantes de podredumbres (Bentancourt y Scatoni, 2006).

Existe cierta tendencia a que *A. sphaleropa* sea encontrada más comúnmente en vid y *B. salubricola* en manzanos y perales (Núñez y Scatoni, 2013).

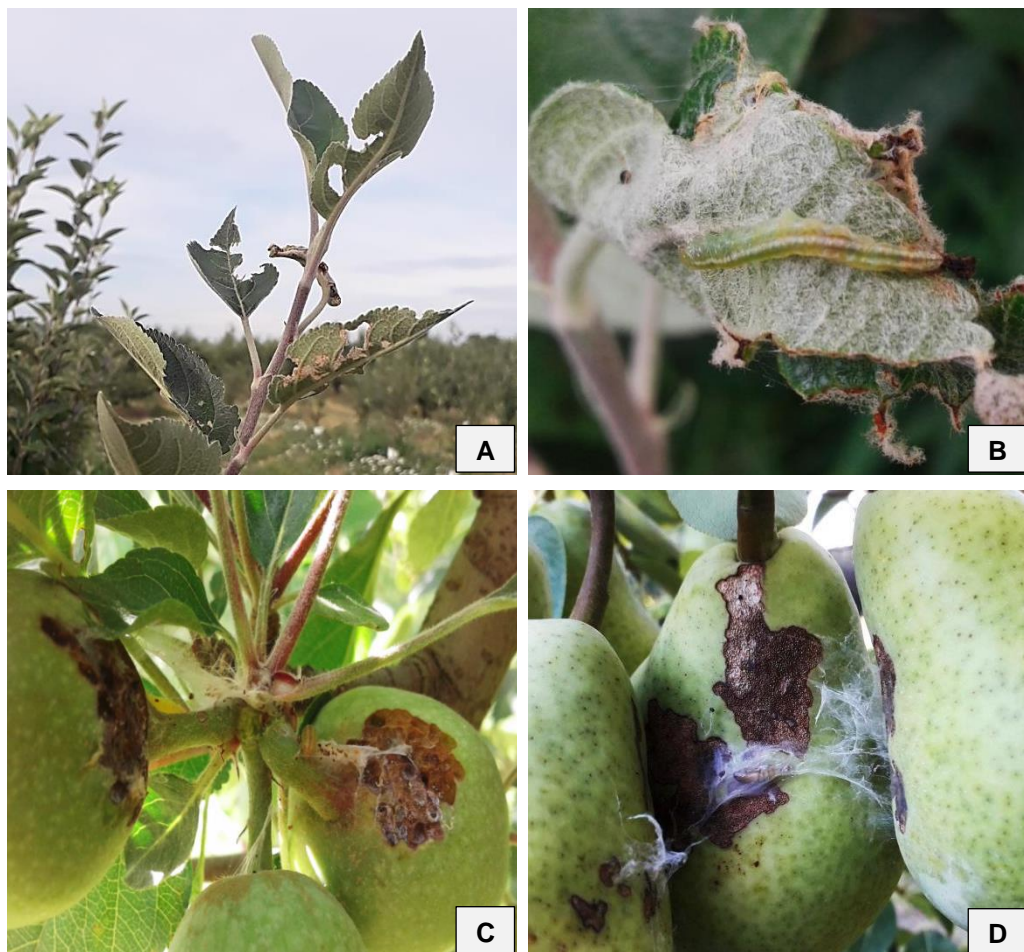


Figura 2. Daño de lagartitas en brote de manzano (A) y larva de *Bonagota salubricola* alimentándose de hoja de manzano con el enrollamiento característico de la misma (B). Daño superficial en frutos consecuencia de la alimentación de una sola larva en racimo de manzanas (C) y peras (D) con presencia de tela.

1.2.2.5. Manejo de ambas plagas

En la actualidad, la estrategia más utilizada para el control de las lagartitas es la aplicación de insecticidas específicos en base a un umbral establecido de capturas de machos adultos en trampas de feromona. Se coloca una trampa de cada especie cada 4 hectáreas de cultivo, y si las capturas sumadas de *A. sphaleropa* y *B. salubricola* en ambas trampas supera los 20 adultos/semana se procede al control químico.

Los tipos de insecticidas recomendados para su control son los fisiológicos o reguladores del crecimiento y las Spinosinas. Por lo general, en promedio, son necesarias de tres a cuatro aplicaciones de insecticidas por temporada para obtener fruta de valor comercial (Núñez et al., 2002). Sin embargo, muchas veces el control químico no es suficiente para reducir el impacto de estas plagas por debajo del nivel de daño económico, no alcanzándose así los niveles de control deseados (Núñez y Scatoni, 2013).

1.3. FEROMONAS SEXUALES DE LEPIDÓPTEROS

Los insectos dependen en gran medida de su sistema olfativo como medio de percepción del entorno; de hecho, usan una variedad de claves químicas volátiles para regular muchos de sus procesos vitales. Estas claves o señales químicas consisten en una amplia gama de semioquímicos, esto es, sustancias químicas que permiten el intercambio de información entre organismos (Witzgall et al., 2008). Cuando la interacción tiene lugar entre dos organismos de la misma especie el semioquímico actúa como una señal intraespecífica y se conoce como feromona. El término feromona fue definido por Karlson y Lüscher (1959) como aquellos compuestos que emitidos por un individuo, incluso en pequeñas cantidades, inducen reacciones específicas de comportamiento o desarrollo en individuos de la misma especie.

En los lepidópteros la comunicación química mediante feromonas cumple, entre otros, un rol muy importante en su biología reproductiva. Las feromonas sexuales son compuestos generalmente volátiles, emitidos por individuos adultos para atraer al sexo opuesto con fines reproductivos. La estructura y estereoquímica de los diferentes componentes de la feromona, así como sus proporciones relativas en la mezcla, determinan la particularidad de que sean especie-específica (Sellanes, 2011).

Las hembras son quienes emiten las feromonas sexuales para atraer machos co-específicos desde largas distancias. Son producidas en las glándulas abdominales y conformadas por una mezcla de componentes en proporciones definidas y específicas. La emisión de feromona involucra un comportamiento especializado conocido como “llamada”, que consiste en la extrusión de la glándula de feromona. Esta ocurre a una determinada hora del día y su periodicidad tiene un ritmo circadiano. Los machos perciben las feromonas sexuales emitidas por hembras de su misma especie (o desde un punto fijo en el espacio) a través de sus antenas. La feromona se difunde en el aire adquiriendo una distribución característica conocida como pluma de olor, a la que el macho responde a contra viento (anemotaxis positiva) con un vuelo constante en zigzag hacia la fuente de emisión de la señal. (Howse 1998, Witzgall et al. 2010, Sellanes 2011, González et al. 2012, Haguaburu et al. 2019). Desde el punto de vista químico, las feromonas sexuales de lepidópteros son en su mayoría cadenas hidrocarbonadas oxigenadas de cadena media a larga, y se componen por alcoholes, acetatos o aldehídos.

1.3.1. Aplicación de las feromonas sexuales de lepidópteros

Actualmente se conoce que la aplicación de feromonas sexuales para el control de plagas ofrece varias ventajas con respecto a la aplicación de insecticidas convencionales (Witzgall et al., 2008). Las características más destacables de las feromonas sexuales es que son específicas, biológicamente activas en cantidades extremadamente bajas (nanogramos)

y son volátiles e inocuas, no resultando tóxicas para el ambiente ni la salud humana (Witzgall et al. 2010, Heguaburu et al. 2019, Guerrero et al. 2020). El descubrimiento del potencial que tienen estas sustancias químicas en la modificación del comportamiento de los insectos surgió luego de la identificación de la primera feromona sexual denominada bombicol perteneciente al gusano de seda (*Bombyx mori*, Lepidoptera: Bombycidae) (Butenandt, 1959). A partir de la década del 60 se comenzó a profundizar en el estudio de la comunicación química en insectos plagas agrícolas y forestales, con el objetivo de desarrollar estrategias de manejo alternativas al uso de insecticidas y menos nocivas para el ambiente y la salud humana (Witzgall et al. 2010, González et al. 2012). Tras varias décadas de avance en el estudio de semioquímicos (www.pherobase.com), las feromonas sexuales son las que han sido estudiadas más intensamente y, en consecuencia, más explotadas en aplicaciones prácticas.

Las feromonas sexuales de lepidópteros han resultado muy útiles en la agricultura, especialmente en programas de manejo integrado (MIP), siendo utilizadas para la detección y monitoreo poblacional de plagas, así como para el control de las mismas mediante diversas estrategias como la confusión sexual (mating disruption), el trapeo masivo, atraccidas (attract and kill) y repeler y atraer (push-pull) (González et al. 2012, Guerrero et al. 2020).

1.3.1.1. Detección y monitoreo

Este ha sido el uso más extendido y exitoso de las feromonas sexuales a nivel mundial. Las capturas de machos en trampas cebadas con septos de feromonas sintéticas de hembras permiten detectar la presencia de un insecto específico y determinar su fluctuación poblacional en el transcurso del tiempo (Figura 3). El monitoreo de la población permite relacionar las capturas de machos en trampas con la abundancia de la plaga, pudiendo utilizarse como método predictivo. Esto ha posibilitado la utilización de

umbrales de capturas preestablecidos que determinen los momentos más oportunos para aplicar medidas de control (Witzgall et al. 2010, Núñez y Scatoni 2013, Haguaburu et al. 2019). El monitoreo también puede emplearse para verificar la efectividad de las medidas de control aplicadas.



Figura 3. Trampa tipo delta triangular utilizada comúnmente para monitoreo de lepidópteros en cuyo centro se coloca el septo impregnado con la feromona sexual de la especie objetivo (izquierda) y en la base se sitúa un piso engomado donde quedan retenidos los machos capturados (derecha).

1.3.1.2. Técnica de confusión sexual y su aplicación en plagas del manzano

Como los insectos dependen de la comunicación mediante feromonas sexuales volátiles para el apareamiento, la saturación de un cultivo con grandes cantidades de feromona sexual de una especie, por períodos prolongados, puede interrumpir la comunicación química entre sexos y suprimir el apareamiento al interferir con la búsqueda de pareja (Miller et al. 2006, Witzgall et al. 2010). Este mecanismo de control es conocido como técnica de confusión sexual o interrupción del apareamiento, y para la misma no es necesario utilizar una mezcla que imite exactamente la feromona natural del insecto para que resulte efectiva (Witzgall et al. 2010, Haguaburu et al. 2019). De hecho, el efecto de confusión puede llegar a funcionar

utilizando únicamente el componente mayoritario de la mezcla o mezclas simplificadas (Stelinski et al., 2008), aunque en este último caso puede darse el fenómeno de resistencia como sucedió con *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae) en el cultivo de té (Mochizuki et al., 2002). La emisión al medio de una versión sintética de la feromona natural del insecto en cantidades suficientes (gramos) como para crear una concentración uniforme de la sustancia en el aire, enmascara la feromona natural de la hembra haciéndola imperceptible para el macho. De esta forma se compromete la capacidad del sistema olfativo de los machos para recibir el estímulo de la feromona natural de la hembra.

Esta técnica de manejo de plagas es aplicada exitosamente para el control de lepidópteros, fundamentalmente polillas, y otras plagas que dependen de la comunicación química a larga distancia (Miller et al., 2006). Su implementación genera reducción en el número total de apareamientos como resultado de la inhibición sensorial, el enmascaramiento de trazas olfativas naturales y la competencia entre feromona sintética y natural, resultando en un retraso en el apareamiento. La combinación de estos efectos conduce a una reducción de la capacidad reproductiva global del insecto objetivo y, en consecuencia, una reducción en la población de la siguiente generación (Miller et al. 2006, González et al. 2012).

Existe en la actualidad una industria viable de feromonas que se encuentra en estado de expansión. Hasta el momento se han desarrollado diversos productos de confusión sexual para más de una veintena de especies de insectos, que son aplicados en más de 750.000 hectáreas en todo el mundo (Miller y Gut, 2015).

Desde los años noventa hasta la actualidad, el uso de confusión sexual ha venido creciendo casi exponencialmente en ciertos cultivos. Entre los ejemplos más conocidos de uso exitoso de esta técnica para la protección de cultivos es para el control de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera

Tortricidae) y *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) en frutales de hoja caduca.

La polilla de la manzana *Cydia pomonella*, comúnmente conocida como Carpocapsa, es una de las principales plagas que ha impulsado la investigación y los programas de desarrollo de la industria de semioquímicos. Tanto así, que más de 220.000 hectáreas de frutales de pepita en todo el mundo son tratadas anualmente con formulaciones sintéticas de feromonas para esta plaga de forma exitosa (Stelinski et al. 2008, Miller y Gut 2015). Los inconvenientes ocasionados por el uso de insecticidas fueron un fuerte incentivo para el desarrollo de la confusión sexual de esta especie durante la década de 1990. Históricamente, el metilazinfos, un insecticida organofosforado neurotóxico, fue el más eficaz para el control de carpocapsa. Sin embargo, la creciente incidencia de resistencia fisiológica debido al uso repetido y persistente exigió opciones de control alternativas.

Existen diversos aspectos que determinan el éxito de esta técnica, uno fundamental es la correcta y suficiente saturación del aire del cultivo con la feromona sintética del insecto objetivo, que depende directamente de las características de los emisores de feromona. Desde que se logró la síntesis de feromonas a escala industrial a final de los años ochenta, posibilitando el uso comercial de la confusión sexual, la tecnología asociada al diseño y desarrollo de los emisores de feromona ha tenido un rol fundamental en el avance de esta técnica (Witzgall et al. 2010, Haguaburu et al. 2019). Existe una gran variedad de emisores de feromona, sin embargo los más utilizados son aquellos de aplicación manual, y entre éstos, los más comunes son los emisores de alambre forrados con polietileno (Haguaburu et al., 2019).

Distintos factores pueden provocar la pérdida de feromona contenida en los emisores. Las altas temperaturas y la mayor velocidad del viento hacen que aumente la tasa de liberación de la feromona, agotándose más rápidamente el contenido del emisor. La configuración del predio, el relieve

del terreno y la descomposición por acción de rayos UV también aumentan las pérdidas. Por ello, el diseño de estas formulaciones se ha enfocado en obtener dispensadores que permitan la liberación de feromona durante un tiempo prolongado, la protección del ingrediente activo que es sensible a la degradación, y que sean de fácil aplicación y accesibilidad en el mercado (Miller y Gut, 2015).

La efectividad de la técnica de confusión sexual depende a su vez de características del predio, en particular el tamaño del área a tratar y la densidad de población del insecto a controlar (Sellanes, 2011). La confusión sexual es más efectiva si es aplicada en grandes áreas, en lo que comúnmente se conoce como manejo de plagas en área extensa (Zoppolo et al., 2016). Esto se debe a que las grandes superficies reducen el efecto inmigratorio de hembras grávidas hacia el interior de las parcelas tratadas, al disminuir la incidencia de los bordes, facilitando además la homogénea circulación de la feromona, limitando la pérdida lateral del ingrediente activo (Witzgall et al., 2010). La técnica además resulta eficaz cuando la densidad poblacional del insecto a controlar es baja, es por ello que los emisores deben instalarse temprano en la temporada con el fin de actuar sobre los primeros machos adultos emergidos, siendo a veces necesaria una aplicación previa de insecticida para disminuir la población inicial de la plaga (Witzgall et al. 2008, Witzgall et al. 2010, Miller y Gut 2015, Haguaburu et al. 2019).

El parámetro más comúnmente utilizado para indicar si la confusión sexual fue exitosa son los datos de capturas de machos en trampas de feromona colocadas dentro del cultivo. Es de esperar que en un ambiente saturado con feromona las capturas obtenidas sean cercanas a cero. Sin embargo, es posible registrar bajas capturas en trampas y aun así detectar un número considerable de hembras copuladas, ya que estas pueden ingresar fecundadas de fuera de la parcela tratada con confusión sexual. Por

esto, se hace imprescindible complementar estos datos con la inspección visual del cultivo para evaluar posibles daños (Sellanes, 2011).

1.3.1.3. Feromonas sexuales de *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota salubricola*

Las feromonas sexuales de *A. sphaleropa* y *B. salubricola* están identificadas y se componen por mezclas de compuestos. La de *A. sphaleropa* fue identificada en nuestro país y está compuesta por (Z,Z)-11,13-tetradecadienal (Z11,13-14:Ald), (Z)-11-tetradecenal (Z11-14:Ald), acetato de (Z)-11,13-tetradecadienilo (Z11,13-14:Ac) y acetato de (Z)-11-tetradecenilo (Z11-14:Ac), en una proporción relativa de 4:1:40:10 en glándulas de hembras (Núñez et al. 2002). Sin embargo, posteriormente, se demostró que a nivel de aplicación en campo los mejores resultados se obtuvieron utilizando una mezcla de los componentes Z11,13-14:Ac, Z11,13-14:Ald y Z11-14:Ald en proporciones 4:4:1, respectivamente (Legrand et al. 2004, Bavaresco et al. 2005, Morandi-Filho et al. 2007).

La feromona sexual de *B. salubricola* contiene un componente mayoritario que es el acetato de (E,Z)-3,5-dodecadienilo (E3,Z5-12:Ac) y dos componentes minoritarios: acetato de (Z)-9-hexadecenilo (Z9-16:Ac) y acetato de (Z)-5-dodecenilo (Z5-12:Ac) en proporciones 8:1:1, respectivamente (Unelius et al.1996, Eiras et al.1999). En el caso de esta feromona los mejores resultados de monitoreo se logran utilizando los tres componentes de la mezcla y no así individualmente (Núñez, 1999).

La feromona sintética de *B. salubricola* se encuentra actualmente disponible comercialmente para su utilización en monitoreo (ISCA Technologies, Alpha Scents Inc.). En Brasil, Pastori et al. (2012) evaluaron la técnica de confusión sexual para esta especie, en simultáneo con la de Grafolita, mediante una única formulación de tipo SPLAT[®]. Este trabajo es el primer y único antecedente que existe de evaluación de este método para

esta plaga, en el cual se obtuvieron resultados promisorios. Entre ellos, las capturas de machos en trampas de feromona de *B. salubricola* fueron menores en las parcelas tratadas con confusión sexual, y la instalación de los emisores temprano en la temporada (octubre) fue la más eficiente en la disrupción del apareamiento.

La feromona sintética de *A. sphaleropa* también se encuentra disponible comercialmente con fines de monitoreo (Alpha Scents Inc.). Asimismo, la Facultad de Química de la Universidad de la República ha estado sintetizando esta feromona para impregnar septos que son distribuidos y utilizados para monitoreo por parte de los productores integrantes del Programa de Manejo Regional de Plagas. Aunque en nuestro país se ha logrado poner a punto la síntesis de esta feromona, la escala de trabajo alcanzada ha sido de 15 gramos, resultando insuficiente para la implementación de la técnica de confusión sexual, la cual requiere una escala mínima de 50 gramos/hectárea (Heguaburu et al., 2019). Debido a esta dificultad y a la no disponibilidad comercial de emisores de feromonas de *A. sphaleropa* y *B. salubricola* fue que se trabajó en colaboración con la empresa Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón), dedicada a la síntesis de feromonas a gran escala, quién produjo las partidas experimentales de los emisores de feromonas para la realización de este trabajo.

Para el sector frutícola nacional sería importante continuar con el desarrollo e implementación de métodos de control más sustentables, menos nocivos para la salud y el medio ambiente, y que además puedan ser utilizados en conjunto con la confusión sexual de *Carpocapsa* y *Grafolita*. Es por esto que el estudio y aplicación de la técnica de confusión sexual para las lagartitas de los frutales se visualiza como una herramienta factible y promisoriosa (Legrand et al. 2004, Bavaresco et al. 2005, Pastori et al. 2012).

Las hipótesis de trabajo planteadas fueron:

1. La utilización de feromonas sexuales mediante la técnica de confusión sexual es eficiente en el control de *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota salubricola*.

2. La técnica de confusión sexual es tan o más eficiente que el control convencional con insecticidas.

3. Los emisores de feromona de ambas especies emiten feromona en cantidad suficiente durante la temporada productiva.

El objetivo general del presente trabajo fue desarrollar una estrategia de control para *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota salubricola* como alternativa al control químico convencional en los frutales de pepita.

Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

1. Evaluar la eficacia de la confusión sexual para el control de *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota salubricola*.

2. Evaluar la duración de la emisión de ambas feromonas.

Este trabajo se enmarcó en el proyecto “*Producción y evaluación de feromonas sexuales para el control de tortricidos nativos (Lepidoptera: Tortricidae) en frutales de pepita*” del Departamento de Química del Litoral, un trabajo en conjunto de las Facultades de Química y Agronomía. Dicho proyecto fue financiado por el Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. SITIOS DE ESTUDIO Y APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

La técnica de confusión sexual para el control de *A. sphaleropa* y *B. salubricola* fue evaluada durante tres temporadas productivas consecutivas, desde la primavera de 2016 hasta el otoño de 2019, en establecimientos frutícolas de la zona sur de Uruguay. Los predios seleccionados participaban del Programa de Manejo Regional de Plagas, por tanto, habían implementado desde el año 2012 el uso de confusión sexual para carpocapsa (*Cydia pomonella*) y grafolita (*Grapholita molesta*) con emisores ISOMATE® a razón de 500 y 250 emisores/ha, respectivamente.

Para la evaluación del uso y eficacia de las feromonas sexuales de ambas especies se seleccionaron tres predios que tuviesen cultivos comerciales de manzanos e historial de daño de estas plagas. Los mismos estaban ubicados en la zona frutícola de Melilla, en el Departamento de Montevideo. Los cuadros de manzanos, en su mayoría, estaban instalados en alta densidad con un marco de plantación de 3,7 – 4 m entre filas y 1 m entre plantas. La edad promedio estimada de los mismos era de 10 a 12 años de antigüedad. Las principales características de los sitios de estudio se muestran en el Cuadro 1. Para el análisis se utilizó un diseño en bloques completos al azar para todos los años, considerando cada predio como un bloque.

En cada bloque se evaluaron dos tratamientos: confusión sexual con instalación de emisores de feromona de *A. sphaleropa* y de *B. salubricola*, y control convencional con aplicación de insecticidas según información proporcionada por el monitoreo en trampas. En cada sitio de estudio se definieron dos parcelas de aproximadamente 4 hectáreas cada una, separadas por un mínimo de 200 m. Los tratamientos fueron asignados a cada parcela según la dirección de los vientos dominantes durante la

temporada para evitar la deriva de feromonas desde el tratamiento de confusión sexual hacia el control. A las parcelas se les asignó el mismo tratamiento en los tres años del estudio, en los tres sitios. Además, en cada predio, ambos tratamientos debían compartir las mismas variedades o variedades de similar fecha de cosecha, para hacer posible la comparación de los resultados (Figura 4).

Cuadro 1. Principales características de los sitios de estudio. Descripción de las variedades de manzano y superficie (ha) de los cuadros que componen las parcelas de ambos tratamientos en cada predio.

Predio		1		2		3	
Ubicación		Cno. El Polvorín y Los Naranjos		Cno. Los Pirinchos		Cno. Paja Brava	
Coordenadas		34°48'2.65"S 56°17'3.28"O		34°44'10.05"S 56°17'57.07"O		34°43'54.97"S 56°19'39.77"O	
		Variedad	Superficie	Variedad	Superficie	Variedad	Superficie
Tratamiento	Confusión sexual	Gala	0,89	Red delicious	0,65	Early red one	3,60
		Red-Gala	1,75	Genérico**	1,29		
		Red scarlet	0,65	Galaxy-Red	0,53		
	Control convencional			Red chief	0,61		
		Gala	1,64	Early red one	1,80	Early red one	4,10
		Red-Gala*	1,22	Red chief	1,28		
Red chief	0,74	Red delicious	0,60				

* Red-Gala: alternancia de una fila de Gala cada dos filas de Red delicious

** Genérico: variedad de manzano desconocida por el productor

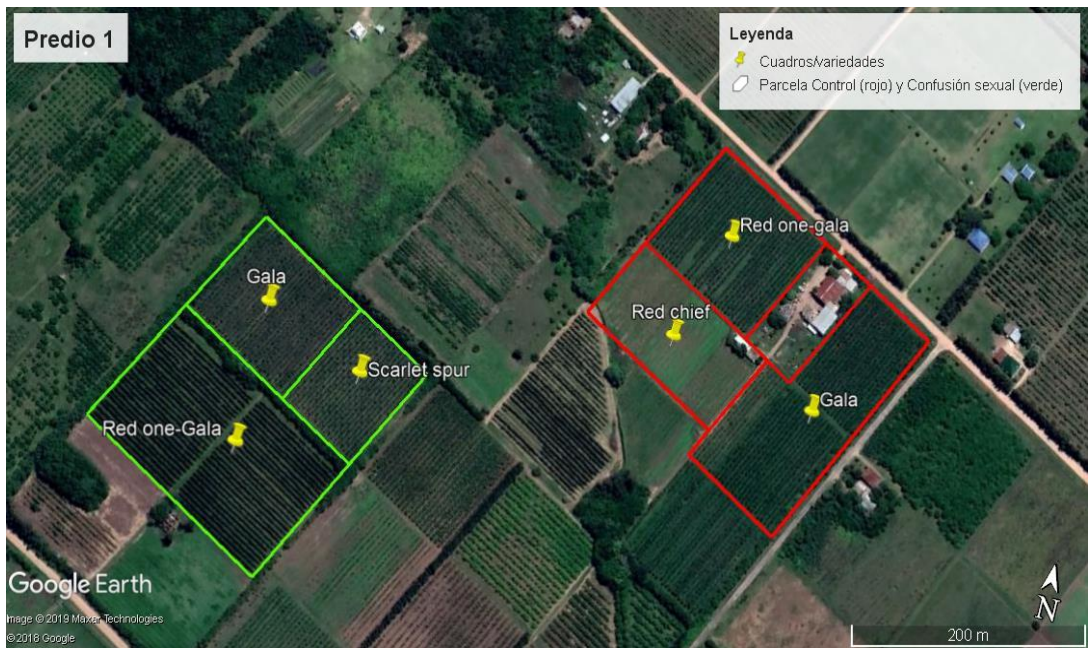




Figura 4. Imagen aérea de los tres predios (identificados en el margen superior izquierdo). Las parcelas delimitadas en color verde corresponden al tratamiento de confusión sexual y en color rojo al control convencional, con sus respectivas variedades de manzano.

El primer año del ensayo, correspondiente a la temporada 2016/17, fue realizado únicamente en el predio 1, a modo de evaluación exploratoria, mientras que en las siguientes dos temporadas se incorporaron en el estudio a los otros dos predios. Por tanto, de los datos obtenidos de esa evaluación exploratoria solo se incluirán y analizarán en este trabajo aquellos que permitan una comparación estadística con los obtenidos de las siguientes dos temporadas (ver evaluación de la tasa de liberación de feromonas en condiciones de campo, sección 2.2.4).

2.1.1. Aplicación de la confusión sexual

El registro de las capturas de machos adultos en trampas de feromona (PHEROCON ® VI Trap, TRECE) instaladas y monitoreadas desde principios de octubre (ver monitoreo de adultos, sección 2.2.1), permitió identificar el momento más oportuno para la instalación de los emisores de

confusión sexual de ambas especies, previo al vuelo de adultos de diciembre. Los emisores de confusión sexual utilizados son los de tipo cuerda (Figura 5), fabricados en polietileno y de forma individual para cada especie, que fueron proporcionados como partida experimental por la empresa Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón). Se recibieron sellados al vacío y se mantuvieron en freezer hasta el momento de su instalación en los primeros días de noviembre de cada año. Cada emisor contenía 100 mg de mezcla de ingredientes activos con una composición química como se detalla en el Cuadro 2.

Los emisores se instalaron manualmente y fueron dispuestos en el tercio superior de las plantas, evitando la incidencia directa de los rayos solares para prevenir una rápida descomposición de la feromona. La densidad colocada fue de 500 emisores de cada especie por hectárea, equivalente a una dosis de 50 gramos de feromona por hectárea. La distribución de los mismos se hizo en función del marco y la densidad de plantación de los cuadros que integran cada parcela. A su vez, se reforzaron los bordes de la parcela colocando allí mayor número de emisores. Estos emisores son biodegradables por lo que no es necesario retirarlos al final de cada temporada.

Cuadro 2. Composición de la feromona formulada para cada especie según datos del fabricante (Shin-Etsu Chemical Co.).

Especie	Componentes	Proporciones
<i>Argyrotaenia sphaleropa</i>	(Z)-11,13-Tetradecadienal	85
	Acetato de (Z)-11,13-tetradecenilo	5
	(Z)-11-Tetradecenal	5
	Acetato de (Z)-11-tetradecenilo	5
<i>Bonagota salubricola</i>	Acetato de (E,Z)-3,5-dodecadienilo	47,6
	Acetato de (E,Z)-3,5-tetradecadienilo	2,4
	Acetato de (Z)-5-dodecenilo	2,4
	Acetato de (Z)-9-hexadecenilo	47,6



Figura 5. Emisores tipo cuerda de polietileno para confusión sexual de *Argyrotaenia sphaleropa* de color rojo (izquierda) y de *Bonagota salubricola* en color marrón (derecha).

2.1.2. Manejo de plagas en las parcelas experimentales

Las parcelas experimentales tuvieron un manejo diferencial durante la temporada. En la parcela con confusión sexual no se permitió la aplicación de insecticidas tales como organofosforados, piretroides, metoxifenocida, spinosad y spinetoram, porque tienen control sobre *A. sphaleropa* y *B. salubricola*, enmascarando así el posible efecto de las feromonas. Solo se permitió aplicar insecticidas dirigidos a estas especies cuando los datos obtenidos del muestreo semanal de frutos indicasen un daño mayor a 1%, considerado como el máximo daño aceptable, en concordancia con los productores.

Por su parte, en la parcela de control estaban permitidas las aplicaciones de insecticidas específicos para *A. sphaleropa* y *B. salubricola* cuando se superase el umbral de capturas establecido de 20 adultos por

semana en trampas de ambas especies sumadas. Para el control de otras especies plagas del manzano el productor realizó el manejo habitual.

Al final de cada temporada se recabó la información de los insecticidas aplicados en las parcelas de ambos tratamientos en todos los predios, los que fueron extraídos de la base de datos del Registro Nacional Frutihortícola (DIGEGRA 2020). Esta información se utilizó para la comparación entre tratamientos, pero también, para corroborar que efectivamente no se hicieron aplicaciones con insecticidas que controlaran lagartitas en las parcelas de confusión sexual (ANEXO 6.1).

2.2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA CONFUSIÓN SEXUAL

La eficacia de la interrupción del apareamiento para *A. sphaleropa* y *B. salubricola* se evaluó de tres maneras: mediante el registro de las capturas de machos adultos en trampas de feromonas (“silenciamiento” de trampas), por medio de la evaluación de daños en frutos a lo largo de la temporada, y mediante las tasas de apareamiento de adultos en jaulas. Además, se midieron las tasas de liberación de ambas feromonas en condiciones de campo para determinar la durabilidad del emisor, y con ello la eventual necesidad de reinstalación.

2.2.1. Monitoreo de adultos

Se instalaron 24 trampas delta (15 × 15 × 25 cm, PHEROCON® VI Trap, TRÉCÉ) en cada tratamiento de los tres pedios (Figura 6). Doce de ellas fueron cebadas con la feromona de *A. sphaleropa* en septos de goma (Sigma-Aldrich, blanco, 8 mm O.D.) impregnados con mezcla 9:4:4:1 (BHT¹: Z11,13-14Ac : Z11,13-14Ald : Z11-14Ald) de la feromona sintetizada por el equipo de la Dra. Viviana Heguaburu del Departamento de Química del Litoral del Centro Universitario Regional Litoral Norte, Udelar. En la otra

¹ Butilhidroxitolueno (BHT), agente estabilizante.

mitad se colocaron septos impregnados con feromona de *B. salubricola* de origen comercial marca ISCA Technology (0,14% de E3,Z5-12Ac + Z9-16Ac, 99,86% látex) que fueron adquiridos en la cooperativa Jumecal. Para ambos casos, los septos fueron ubicados en el centro de las trampas delta, remplazándose mensualmente los de *A. sphaleropa* y cada 60 días los de *B. salubricola*. Los pisos engomados de las trampas (TRÉCÉ), que fueron provistos por la cooperativa Jumecal, se renovaron cada vez que fue necesario por saturación de insectos.

Las trampas se instalaron a principios de octubre y se retiraron en abril. Se colocaron en el tercio superior de las plantas y se distribuyeron en el centro y en los bordes de cada parcela (Figura 7). Fueron inspeccionadas semanalmente con el fin de determinar la fluctuación poblacional de la plaga a través del registro de las capturas de machos adultos. De esta manera, las trampas permitieron detectar picos de vuelos de adultos y así prever los momentos de emergencia de larvas. Esto posibilitó, en las parcelas de control convencional, tomar las medidas de mitigación correspondientes.



Figura 6. Trampa delta utilizada en los ensayos (15 x 15 x 25 cm, PHEROCON® VI Trap, TRECE) (izquierda), instalación de trampa en el tercio superior de un árbol de manzano (derecha).

Las trampas ubicadas en las parcelas de confusión sexual también fueron monitoreadas durante toda la temporada como forma de verificar si la feromona estaba actuando como un disruptor del encuentro entre machos y hembras. Específicamente, la ausencia de capturas en las trampas de monitoreo, a veces referido como un “silenciamiento” de las mismas, indicaría que los machos no pueden localizar emisores de feromona, por lo tanto se asume que no pueden localizar a las hembras.

Con el objetivo de conocer si ambos tratamientos dentro de un mismo predio partían de la misma población inicial de la plaga se analizaron los datos de capturas de machos previo a la instalación de los emisores de confusión sexual. Para la comparación entre tratamientos dentro de un mismo predio se determinó el valor promedio de las capturas acumuladas y se aplicó la prueba de Wilcoxon para muestras independientes mediante el software estadístico Infostat.

Por otra parte, las capturas semanales de machos en cada trampa, tratamiento y año se acumularon a lo largo de la temporada. Para el análisis de los datos, se utilizó el promedio de las 12 trampas de cada especie para la comparación entre tratamientos y años en cada predio. Para ello se empleó un Modelo Lineal Mixto Generalizado (GLMM), asumiendo distribución Poisson para la variable definida como capturas acumuladas promedio por tratamiento. Debido a la dispersión excesiva de los datos se utilizó un enfoque de Quasi Poisson mediante el software Infostat conectado al estadístico R. Se incluyeron como efectos fijos el año, el predio, el tratamiento y la interacción de año y tratamiento. Se utilizó el método de comparación múltiple DGC para separar las medias de tratamiento (Di Rienzo et al., 2002).



Figura 7. Distribución de las trampas de feromona en la parcela de control convencional (A, C, E) y en el tratamiento de confusión sexual (B, D, F) de los predios 1, 2 y 3, respectivamente. C: control convencional; T: tratamiento con confusión sexual; A: *Argyrotaenia sphaleropa*; B: *Bonagota salubricola*.

2.2.2. Evaluación de daños

Debido a que los ensayos tuvieron lugar en predios comerciales, se estableció un monitoreo semanal de frutos que permitiera detectar rápidamente si el daño por lagartitas excedía el máximo admisible de 1%. Por ello, a partir del mes de diciembre, se monitorearon semanalmente 400 frutos/ha en cada tratamiento seleccionando al azar 20 árboles y observando 20 frutos por árbol. El monitoreo consistió en la observación visual de los frutos para detectar presencia de larvas y/o daño característico de ambas plagas. Si al momento del muestreo se encontraba presente la larva sobre el fruto se le consideró daño nuevo, de lo contrario se registró como daño viejo. Además, en simultáneo, se realizó inspección visual de brotes para identificar ese tipo de daño. En aquellos casos en que se constató daño nuevo, los frutos con larvas fueron llevados al laboratorio de Entomología (Facultad de Agronomía, Udelar). Allí se las mantuvo para que culminaran su desarrollo y proceder a la identificación del adulto, dado que las larvas en los primeros estadios y los daños de estas dos especies no son diferenciables entre sí.

Este monitoreo se realizó con el único objetivo de informar semanalmente al productor de los porcentajes de daño en frutos y para poder detectar cualquier incremento de los mismos por encima del 1%. Los datos obtenidos de este monitoreo no serán analizados estadísticamente.

Para poder analizar estadísticamente los datos de daños se decidió llevar a cabo un monitoreo más exhaustivo de frutos. Para ello, se delimitó un área de 0,5 hectáreas dentro de cada tratamiento en los tres predios. En esa superficie y en cada muestreo, se seleccionaron un tercio de la totalidad de las filas, se escogieron 8 árboles al azar y se muestrearon 20 frutos en cada uno, alcanzando un total de 800 frutos en cada monitoreo. Se observó daño nuevo y viejo en frutos y se registraron las filas y árboles que fueron muestreados. Este monitoreo se hizo una vez por mes durante los meses de

enero a marzo, y al seleccionarse filas diferentes en cada fecha, al mes de marzo todas las filas habían sido inspeccionadas.

Para el análisis de los datos se consideró el árbol como repetición y la información obtenida permitió comparar el daño total para las tres fechas, entre la parcela de confusión sexual y la de control convencional, en los tres predios. El porcentaje de fruta dañada, para cada año se analizó utilizando GLMM, asumiendo una distribución binomial. En el análisis se incluyeron el tratamiento, la fecha de muestreo y la interacción de tratamiento y fecha de muestreo como efectos fijos.

2.2.3. Apareamiento de adultos en jaulas

La efectividad de la técnica de confusión sexual para *A. spahleropa* y *B. salubricola* fue evaluada en campo, realizando pruebas de cópula y comparando la puesta de huevos viables entre ambos tratamientos. Para esto fue necesario mantener una cría de ambas especies en laboratorio, durante varios meses, para obtener un número adecuado de adultos vírgenes y de edad conocida, que permitiese completar el experimento en el campo.

Los adultos vírgenes de *A. spahleropa* y *B. salubricola* se obtuvieron de crías de laboratorio iniciadas a partir de larvas recolectadas en campo de brotes de manzano. Las crías se mantuvieron a 25 °C y 70% de humedad relativa, bajo un fotoperíodo de 14:10 L:O, en el laboratorio de Entomología. Las larvas se alimentaron con la dieta artificial ligeramente modificada de Shorey y Hale (1965). La dieta se preparó en base a 400 mL de agua en ebullición en la que se disolvieron 15 g de agar-agar. A esto se le agregaron 120 g de porotos de manteca previamente hidratados durante 24 h, 50 g de germen de trigo, 15 g de levadura, 2 a 3 g de ácido sórbico, 25 g de ácido ascórbico y dos manzanas cortadas con cáscara. La mezcla se procesó en licuadora hasta formar una pasta homogénea que se colocó en recipientes y se secó en horno a 180 °C por 30 min.

Las pupas obtenidas se colocaron individualmente en pequeñas cajas plásticas compartimentadas, para asegurar que los adultos emergidos fueran vírgenes. Algunos adultos fueron transferidos a tubos de vidrio cilíndricos abiertos en ambos lados ($\varnothing = 8,5$ cm, altura = 10,5 cm) con libre acceso a una solución de aguamiel (proporción 9:1) para su alimentación, con el propósito de mantener la cría. Estos recipientes estaban forrados internamente con papel manteca, sobre el cual las hembras fecundadas realizaban las puestas. De esta manera las puestas se retiraban fácilmente y las larvas recién emergidas eran colocadas en recipientes herméticos con dieta artificial (Figura 8).

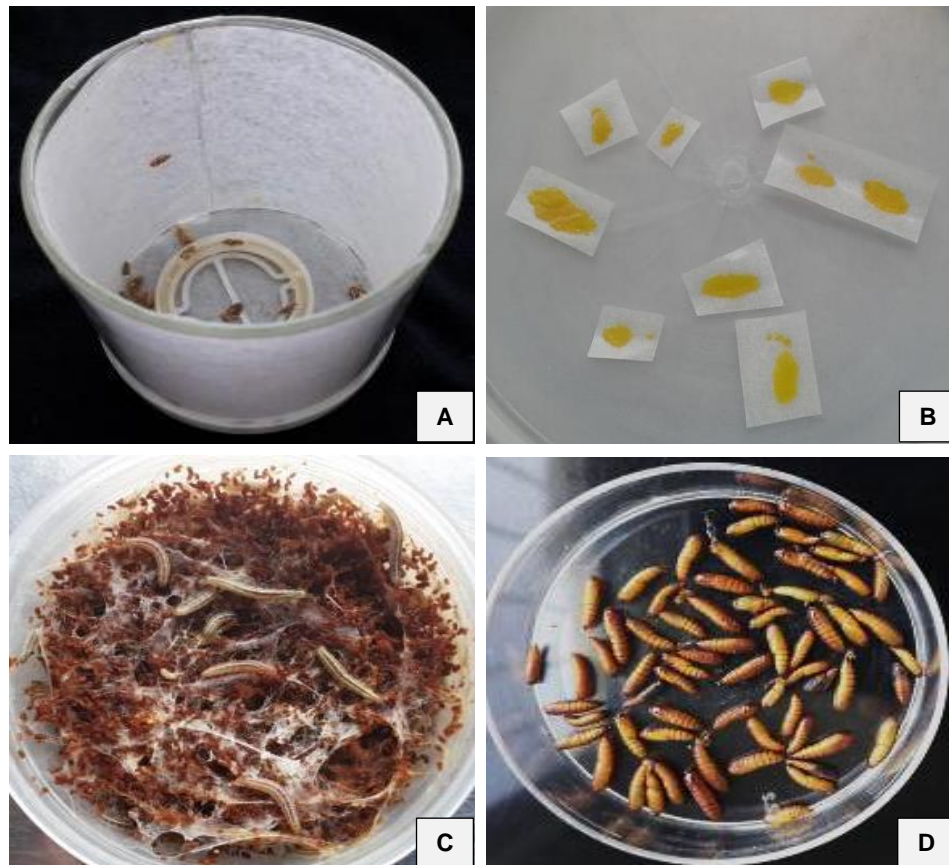


Figura 8. Cría artificial de *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota salubricola*. Recipiente para el apareamiento de adultos (A) y puestas de huevos sobre papel manteca retiradas de los mismos (B). Larvas alimentándose sobre dieta artificial (C) y pupas recolectadas (D).

El ensayo de campo para determinar la tasa de apareamiento se llevó a cabo en el predio 3, en febrero de 2019. Para el diseño y ejecución del mismo se adaptaron procedimientos similares a los realizados por Briand et al. (2012) y Hoshi et al. (2016) para otros lepidópteros plaga. Las jaulas utilizadas fueron rectangulares (0,61 x 0,36 x 0,36 m) de malla plástica negra que permitía el ingreso de luz y ventilación al interior. El piso de las mismas fue de tela plástica transparente con un cierre de doble apertura en una de sus caras laterales. Constaban con dos asas laterales y una superior con las cuales fueron colgadas a las ramas de los manzanos (Figura 9). Las 10 jaulas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química.

Se instalaron diariamente 5 jaulas de cópula en la parcela control y tratamiento, hasta completar el máximo de repeticiones posible según la disponibilidad de adultos. Las mismas fueron ubicadas en el centro de cada parcela, donde se acumula la mayor concentración de feromona en el caso de la parcela tratada.

En el interior de cada jaula se colocó una pareja de adultos vírgenes de un día de edad. Los adultos fueron ingresados al final de la tarde, en caso que no se pronosticaran lluvias, y permanecieron allí durante 24 h. Posteriormente fueron retirados y dispuestos individualmente en tubos de ensayo de plástico. Una vez en el laboratorio, los machos fueron utilizados como reposición para la cría, y las hembras inmediatamente colocadas de forma individual en cajas de Petri plásticas forradas con papel manteca. Estas hembras se mantuvieron allí hasta que murieron, y el método encontrado más sencillo para registrar la ocurrencia de fecundación fue observando si habían realizado puestas de huevos viables. De aquellas que sí lo hicieron, los huevos fueron mantenidos en el laboratorio para verificar si eran fértiles, es decir, si de ellos emergían larvas.

Para *A. sphaleropa*, el ensayo se completó alcanzando un máximo de 22 repeticiones en cada parcela (control y confusión sexual), en un lapso de

tiempo de una semana. Debido a no poder obtener el número necesario de hembras y machos adultos de *B. salubricola* sincronizados para el período evaluado, no se logró concluir el ensayo con esta especie, alcanzándose a realizar únicamente 5 repeticiones.

Los datos de puesta de huevos viables de *A. sphaleropa* fueron analizados como inferencias basadas en dos muestras utilizando la prueba de Wilcoxon (Mann-Whitney U), utilizando el software estadístico Infostat. El nivel de significancia para todas las pruebas fue del 5%. Los resultados correspondientes para *B. salubricola* no se analizaron estadísticamente debido al tamaño reducido de la muestra.



Figura 9. Jaula utilizada para la realización de los ensayos de cópula (A) y vista de la jaula instalada en un árbol de manzano (B).

2.2.4. Evaluación de la tasa de liberación de las feromonas en condiciones de campo

Las tasas de liberación de ambas feromonas se evaluaron realizando análisis gravimétricos para registrar la pérdida de peso de los emisores en condiciones de campo, durante las tres temporadas. Esta metodología además permite determinar, de forma aproximada, si la duración de los

emisores es suficiente para cubrir el período productivo o es necesaria su reinstalación.

A principios de noviembre, en simultáneo con la instalación de los emisores en los predios experimentales, se colgaron 12 emisores de feromona de cada especie en dos árboles contiguos, dentro del parque de la Facultad de Agronomía, al reparo de la incidencia directa de los rayos solares (Figura 10 A, B). Esta ubicación está a 10-15 km de los sitios experimentales, por lo tanto, bajo las mismas condiciones ambientales.

El peso individual de cada emisor se registró semanalmente utilizando una balanza analítica KERN ADB con resolución de 0,1 mg (Figura 10 C). La diferencia entre el peso inicial y final de los emisores correspondería al contenido de feromona de los mismos y la evolución del peso a la tasa de liberación de feromona durante la temporada.

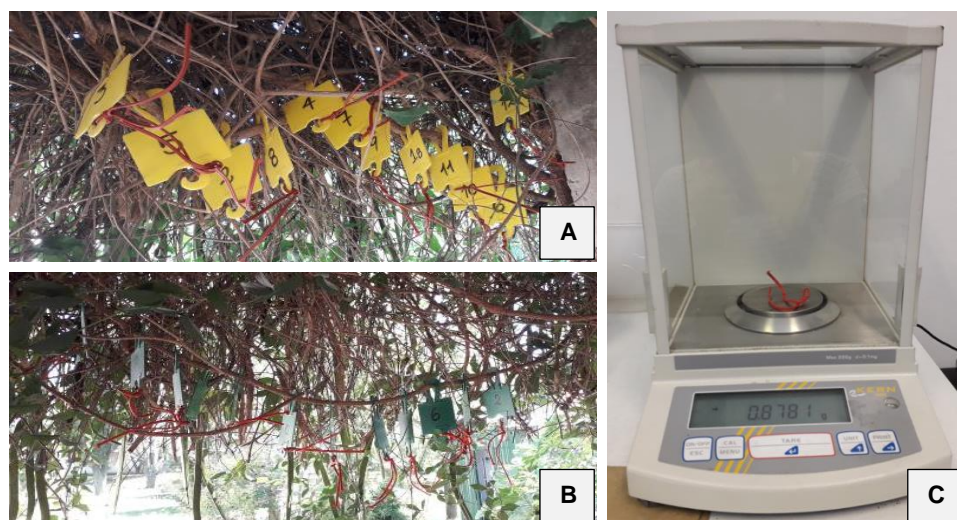


Figura 10. Emisores de *Bonagota salubricola* (A) y *Argyrotaenia spheropa* (B) instalados sobre los árboles en el parque de la Facultad de Agronomía, identificados numéricamente para el seguimiento individual de su peso. Balanza analítica (KERN ADB) de resolución 0,1 mg utilizada para registrar semanalmente el peso individual de los emisores (C).

Teniendo en cuenta la influencia que tiene la temperatura en la tasa de liberación de la feromona, se obtuvieron los datos de temperatura media semanal (°C) del banco de datos agroclimáticos de la Estación Experimental de INIA Las Brujas (INIA, 2019). Estos datos permitieron determinar la caracterización climática de cada temporada y a ello asociar las posibles variantes en el comportamiento de liberación de la feromona desde los emisores.

Los datos de las mediciones de las tasas de liberación de las feromonas se analizaron mediante regresión lineal, con el peso como variable de respuesta y el tiempo (días) como variable independiente, particionando por año, de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X_i + \beta_2 X_i^2 + \varepsilon_{ij}$$

Donde Y_{ij} es el peso del emisor de feromona en el momento i para el emisor j , β_0 , β_1 y β_2 son los parámetros del modelo cuadrático, X_i es el tiempo en días desde el 13 de Noviembre (fecha de la instalación) y ε_{ij} son los residuales del modelo para el momento i para el emisor j , asumiendo $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$, siendo σ_ε^2 la varianza residual.

Para cada año y especie, se calculó la derivada primera de la ecuación cuadrática resultante para determinar los días desde la instalación, en los que los emisores alcanzaron su peso mínimo:

$$\text{Días} = -\frac{\beta_1}{2\beta_2}$$

Todos estos análisis estadísticos fueron realizados con el software Infostat (Di Rienzo et al. 2017).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA CONFUSIÓN SEXUAL

3.1.1. Monitoreo de adultos

Las capturas de machos de *A. sphaleropa* y *B. salubricola* desde la colocación de las trampas en octubre hasta la instalación de los emisores de confusión sexual a principios de noviembre, mostraron que las poblaciones iniciales fueron similares en las parcelas de ambos tratamientos, para los tres predios durante la temporada 2017/18 (Cuadro 3). Sin embargo, en la temporada 2018/19, las poblaciones iniciales de *A. sphaleropa* en todos los predios, y de *B. salubricola* en el predio 1, fueron menores en las parcelas con confusión sexual, posiblemente como resultado del efecto residual del tratamiento con feromonas en la temporada previa.

Estudios realizados por Porcel et al. (2014) reportan este mismo resultado en los tortricidos *Spilonota ocellana* y *Hedya nubiferana*, observado un aumento significativo en el silenciamiento de las trampas entre el primer y el segundo año del estudio. Este efecto podría deberse a la disponibilidad de feromona remanente en los emisores que permanecen en el campo de una temporada a la otra, cuya cantidad emitida al ambiente pareciera ser suficiente para inhibir las capturas.

La posibilidad de realizar el estudio en tres predios distintos posibilitó la evaluación de la efectividad de la técnica bajo diversas situaciones de densidad de plaga. Las capturas de machos adultos registradas en el control convencional en ambas temporadas y en los tres predios, permitieron determinar la fluctuación y la abundancia poblacional, mostrando los picos de capturas correspondientes a las tres generaciones más importantes de ambas especies (Figura 11). Además, con este monitoreo fue posible detectar aquellos valores de capturas que superasen el umbral establecido y así aplicar las medidas de control químico correspondientes.

Cuadro 3. Comparación de capturas de machos de *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota salubricola* en trampas de feromona previo a la instalación de los emisores de confusión sexual (Prueba Wilcoxon). Cada valor representa las capturas acumuladas promedio de 12 trampas durante tres semanas. Los términos del error se representan como error estándar de la media.

Año	Predio	<i>Argyrotaenia sphaleropa</i>			<i>Bonagota salubricola</i>		
		Control	Confusión sexual	p-valor	Control	Confusión sexual	p-valor
2017/18	1	25,7 ± 5,3 A*	27,33 ± 5,1 A	0,582	1,6 ± 0,4 A	1,7 ± 0,7 A	0,547
	2	9,8 ± 1,5 A	8,33 ± 1,2 A	0,794	4,6 ± 1,3A	4,0 ± 1,0 A	0,768
	3	17,1 ± 3,4 A	15,7 ± 2,3 A	0,728	2,0 ± 0,7 A	1,5 ± 0,5 A	0,699
2018/19	1	6,3 ± 1,3 A	1,8 ± 0,6 B	0,001	1,2 ± 0,4 A	0,0 ± 0,0 B	0,002
	2	6,7 ± 1,2 A	0,6 ± 0,3 B	0,0003	1,0 ± 0,3 A	0,3 ± 0,3 A	0,053
	3	23,0 ± 3,0A	2,3 ± 1,1 B	<0,0001	0,3 ± 0,3 A	0,0 ± 0,0 A	0,317

* Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de las filas para cada especie (P < 0,05).

Los datos de capturas registrados en las parcelas del control convencional mostraron que ambas especies presentaron mayores poblaciones en la temporada 2018/19. De hecho, las capturas excedieron el umbral establecido de 20 machos/trampa/semana en ciertas oportunidades, siendo necesario realizar aplicaciones dirigidas a ambas plagas en estas parcelas (ANEXO 6.1).

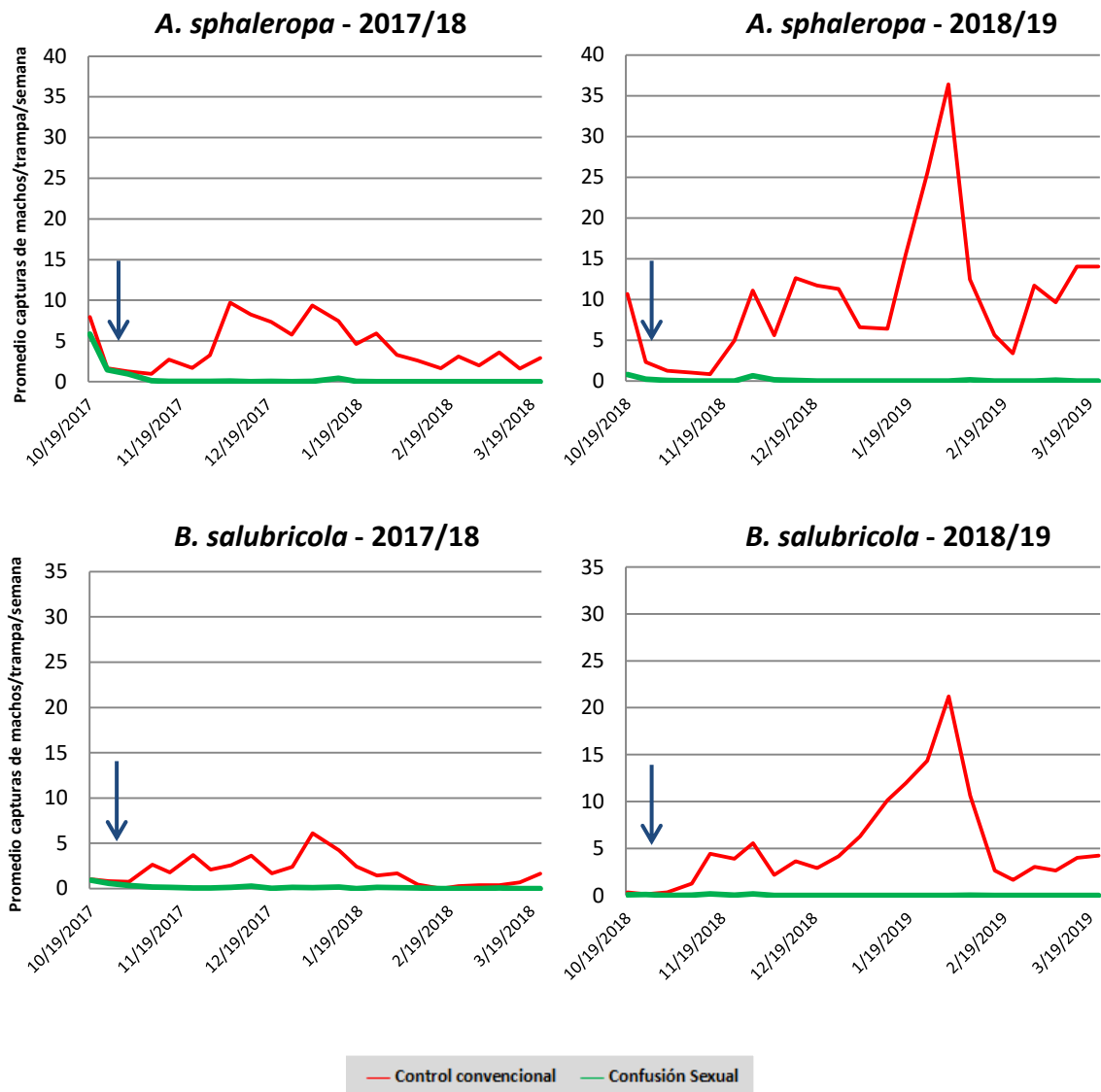


Figura 11. Capturas promedio de machos de *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota salubricola* en el control convencional (línea roja) y en el tratamiento de confusión sexual (línea verde) de los tres predios en los dos años evaluados. La flecha azul indica el momento de instalación de los emisores de confusión sexual.

Para cada año las densidades de población mostraron variabilidad entre los tres predios. Teniendo en cuenta las capturas acumuladas, la especie y el sitio, se puede observar que *A. sphaleropa* fue más abundante

en los predios 1 y 3, mientras que *B. salubricola* fue ligeramente más abundante en el predio 2. Estas tendencias se mantuvieron en ambos años, aunque las capturas totales aumentaron en la segunda temporada (Figura 12).

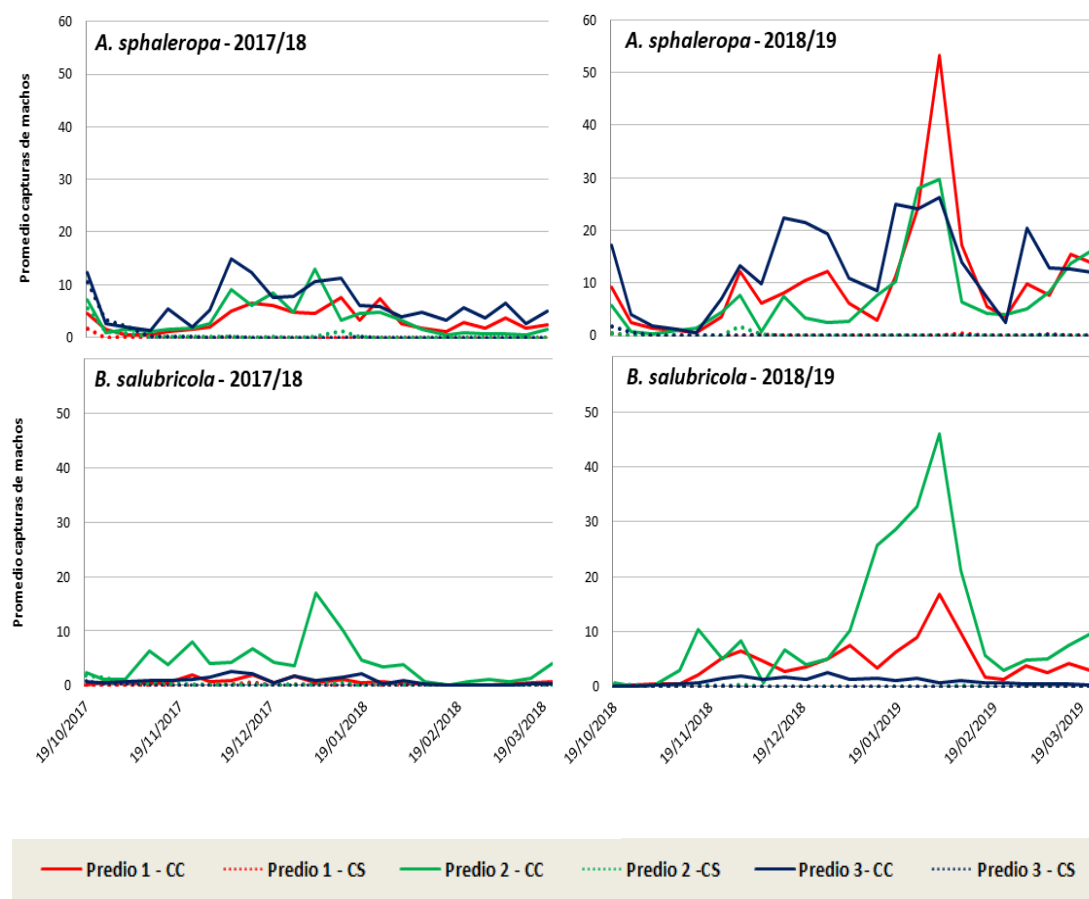


Figura 12. Evolución del promedio de capturas de machos adultos de *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota salubricola* en las trampas de feromona pertenecientes a las parcelas de control convencional (CC- línea entera) y de confusión sexual (CS- línea punteada) de los tres predios y en los dos años evaluados.

En ambos años, las parcelas con control convencional presentaron medias de capturas acumuladas significativamente más altas que en las parcelas con confusión sexual, e incluso hubo diferencias estadísticas entre

años. Se registraron capturas más elevadas de ambas especies en la temporada 2018/19, y este aumento poblacional se vio reflejado posteriormente en los daños ocasionados en frutos.

Las capturas acumuladas promedio por predio que fueron comparadas entre años y tratamientos para cada especie se presentan en el Cuadro 4. El modelo resultó significativo para ambas especies, encontrándose diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos.

La reducción casi a cero en las capturas de machos de *A. sphaleropa* y *B. salubricola* en las parcelas con tratamiento de confusión sexual, en comparación con las parcelas de control, en los tres predios y en ambos años de estudio, fue el resultado de la instalación de los emisores de feromona que evitaron que los machos localizaran las trampas, fenómeno denominado como “silenciamiento de trampas” (Figuras 11 y 12). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pastori et al. (2012) para *B. salubricola* donde, ante la misma población inicial de la plaga, el número promedio de machos capturados en las parcelas con confusión sexual fue significativamente menor que en las parcelas con control integrado. Este mismo fenómeno fue reportado usando emisores de confusión sexual para el control de otros lepidópteros como *Grapholita molesta* (De Lame y Gut, 2006), *Cydia pomonella*, *Spilonota ocellana* (Porcel, et al. 2014), *Cossus insularis* (Hoshi et al. 2016), *Thaumetopoea pityocampa* (Trematerra et al. 2019), entre otros.

La inhibición de las capturas en las parcelas tratadas con confusión sexual sirvió como indicador de que la feromona de ambas especies fue efectiva en confundir a los machos, quienes no fueron capaces de detectar la pluma de feromona emitida por los septos de las trampas de monitoreo. Al tratarse de un ensayo experimental donde se evaluó por primera vez el uso de emisores de feromona de tipo cuerda sintetizados específicamente para estas dos especies, podemos afirmar que la eficacia de la feromona quedó de manifiesto al no registrarse prácticamente capturas de machos durante toda la temporada posterior al momento de su instalación.

Cuadro 4. Capturas acumuladas promedio de *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota salubricola* por tratamiento y año. Los promedios se calculan a partir de las capturas acumuladas de todas las trampas y predios.

Año	Tratamiento	<i>A. sphaleropa</i>	<i>B. salubricola</i>
2017/18	Control convencional	86,07 ± 7,70 b*	28,11 ± 5,29 B
	Confusión sexual	0,98 ± 0,82 c	0,94 ± 0,87 C
2018/19	Control convencional	215,51 ± 12,30 a	84,80 ± 10,90 A
	Confusión sexual	0,98 ± 0,82 c	0,23 ± 0,43 C

* Letras diferentes indican diferencias significativas entre años para cada especie en cada tratamiento (P < 0,05).

3.1.2. Evaluación de daños

El silenciamiento de las trampas de monitoreo es considerada una herramienta valiosa para determinar la eficacia de los emisores de confusión sexual, sin embargo se ha comprobado que el apareamiento puede ocurrir incluso con inhibición total de las capturas en trampas (Porcel et al., 2014).

En ambos años, los resultados de las evaluaciones mensuales de frutos mostraron que el daño por lagartitas promedio de los tres predios, fue similar en las parcelas con confusión sexual y control convencional (Figura 13). En la temporada 2017/18 no fue posible realizar el muestreo correspondiente al mes de marzo debido a que la cosecha tuvo lugar a fines de febrero.

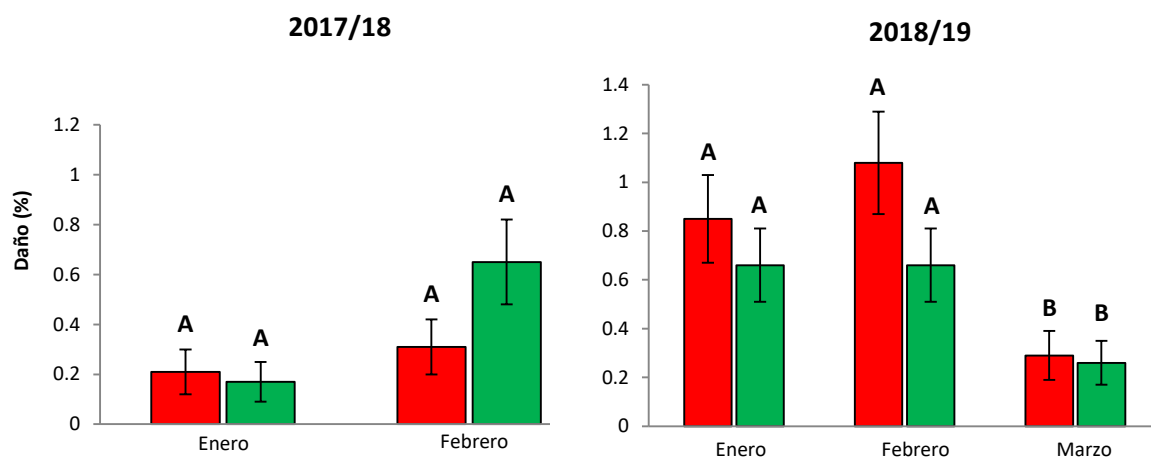


Figura 13. Porcentaje promedio mensual de daño en frutos obtenidos de la evaluación de una muestra mensual de 800 frutos en las parcelas con confusión sexual (barras verdes) y control convencional (barras rojas), promedio de los tres predios para diferentes fechas de muestreos y años. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El análisis estadístico de estos datos revela que no existieron diferencias significativas entre las medias del porcentaje de daño de ambos tratamientos en los dos años. A su vez, en ningún caso fue significativa la interacción entre fecha y tratamiento. En la temporada 2017/18 no hubo diferencias estadísticas entre las fechas monitoreadas, mientras que en la temporada siguiente, el muestreo del mes de marzo se diferenció por tener una media de daño menor. Este descenso registrado en el mes de marzo no es lo esperado si consideramos que el daño tiende a ser acumulativo durante el transcurso de la temporada. Esto puede atribuirse a un error de muestreo, al suceso de un evento climático que haya descartado fruta o a un repase de fruta previo a cosecha realizado por el productor. Los datos presentados por Pastori et al. (2012), en relación al porcentaje de daño en frutos causado por *B. salubricola* comparando parcelas con confusión sexual y control integrado, son coincidentes con los aquí obtenidos, ya que no encontraron diferencias significativas entre tratamientos, e incluso en

presencia de confusión sexual reportaron porcentajes de daño mayores, de hasta 4,75%.

En relación al máximo daño establecido como admisible, en la zafra 2017/18 solo se supera el 1% de daño en la fecha de febrero para el predio 2, esto llevó a que el productor decidiera realizar una aplicación de Metoxifenocida, excluyendo el área destinada al monitoreo mensual de frutos, no afectando así los resultados (Figura 14). La configuración de la parcela de confusión sexual en este predio no es la más apropiada para la aplicación de dicha técnica debido a la gran influencia de los bordes que limitan con el resto del predio sin confusión. La inmigración de hembras fecundadas desde fuera del área tratada puede ser un factor que explique estos resultados, ya que la eficacia en la interrupción del apareamiento aplicando la técnica en un predio específico en comparación con la aplicación a toda un área extensa de cultivo, puede no alcanzar su nivel óptimo (Cardé y Minks 1995, Porcel et al. 2014). Además el productor no realizó la práctica de raleo de frutos, observándose gran cantidad de fruta arracimada en las plantas, generando así un hábitat propicio para el establecimiento y desarrollo de estas plagas.

En la zafra 2018/19 se registró un aumento de los daños en todos los predios como consecuencia de una mayor población de ambas especies. Esto tuvo como resultado que los daños superasen el 1% en los predios 1 y 2 en ambos tratamientos (Figura 14). Cabe destacar que a pesar de ello, los productores permitieron continuar con el ensayo y no hicieron aplicaciones de insecticidas en las parcelas con confusión sexual.

Es importante analizar los resultados de la proporción de daño registrados entre ambos tratamientos teniendo en consideración que en las parcelas con control convencional se realizaron, según el predio y el año, de 1 a 5 aplicaciones de insecticidas dirigidas específicamente a lagartitas o dirigidas a otras plagas pero utilizando ingredientes activos que también las controlan (ANEXO 6.1). Por lo contrario, en las parcelas con confusión sexual no se realizaron aplicaciones de insecticidas dirigidas a lagartitas, a

excepción de lo sucedido durante la temporada 2017/18, en el predio 2. Esto demuestra que con la implementación de la confusión sexual se obtienen resultados comparables a los del control convencional pero disminuyendo el número de aplicaciones de insecticidas con el consecuente beneficio que esto proporciona al trabajador rural y al medio ambiente.

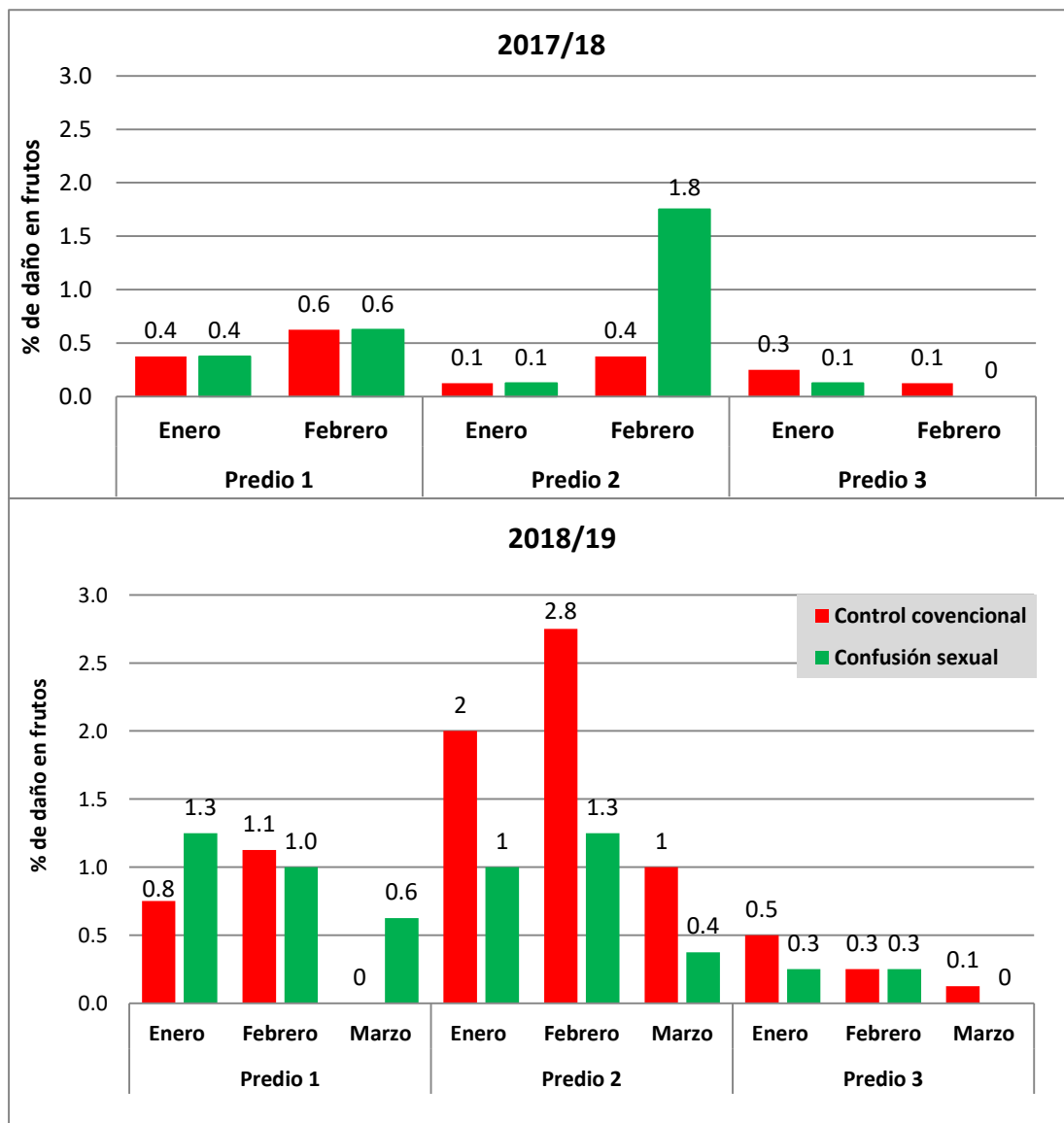


Figura 14. Porcentaje total de daño en frutos resultado de la evaluación de una muestra mensual de 800 frutos en las parcelas con confusión sexual (barras verdes) y control convencional (barras rojas) en cada predio y para las diferentes fechas de muestreo en ambos años.

3.1.3. Apareamiento de adultos en jaulas

Las tasas de apareamiento de parejas en jaulas proporcionaron otra forma de evaluación de la efectividad de la técnica de confusión sexual, específicamente para *A. sphaeropa*, especie con la que se logró completar el ensayo. Las pruebas se realizaron en febrero, a más de tres meses de la instalación de los emisores con la finalidad de determinar si la disponibilidad de feromona cercano a la cosecha aún era suficiente para evitar la cópula.

Las hembras de *A. sphaeropa* colocadas en jaulas dentro de la parcela de confusión sexual tuvieron significativamente menor porcentaje de puesta de huevos viables que las colocadas en el control convencional. Se confirmó que solo aproximadamente un tercio de las hembras que estuvieron expuestas a la feromona se habían apareado con descendencia viable, mientras que la mayoría de las hembras de las parcelas del control pusieron huevos fértiles (Cuadro 5). Estudios similares de evaluación del apareamiento realizados para otros lepidópteros como *Lobesia botrana* (Briand et al., 2012), *Cydia pomonella* (Porcel et al., 2014) y *Cossus insularis* (Hoshi et al., 2016), son coincidentes en que la proporción de hembras fecundadas es mayor en las parcelas del control en relación a las de confusión sexual. Esto demuestra que la capacidad de los machos para localizar a las hembras de *A. sphaeropa* se vio efectivamente reducida en presencia de la feromona.

En el caso de *B. salubricola*, la disponibilidad de machos y hembras vírgenes no fue suficiente para lograr un tamaño de muestra significativo, por lo que, aunque los resultados están en línea con los de *A. sphaeropa*, no se pueden sacar conclusiones.

Cuadro 5. Comparación entre tratamientos del número de hembras con puesta de huevos viables posteriormente al ensayo de apareamiento en jaulas.

Especie	Tratamiento	N	Hembras con puestas viables [N (%)]
<i>Argyrotaenia</i>	Control convencional	22	20 (91%)*
<i>sphaleropa</i>	Confusión sexual	22	7 (32%)*
<i>Bonagota</i>	Control convencional	5	4 (80%)
<i>salubricola</i>	Confusión sexual	5	2 (40%)

* P= 0,0001

Estos resultados estarían indicando que luego de aproximadamente cuatro meses de instalados los emisores de feromona, al menos para *A. sphaleropa*, aún liberan una cantidad adecuada de la misma en condiciones de campo; suficiente incluso para prevenir el apareamiento estando macho y hembra en estrecha proximidad. Esto además reafirma la correcta elección del momento de instalación de los emisores, concordando con lo evaluado por Pastori et al. (2012), donde fechas más tardías de instalación (diciembre) disminuían en casi un 20% la tasa de interrupción del apareamiento.

Estos resultados confirmarían que no habría necesidad de reponer los emisores durante la temporada productiva, repercutiendo favorablemente en la factibilidad económica del uso de la confusión sexual para estas plagas.

3.1.4. Evaluación de la difusión de la feromona en campo

La duración de los emisores de ambas especies se evaluó mediante análisis gravimétricos, registrando el peso de los mismos durante 119 días, desde la colocación de los emisores a principios de noviembre hasta mediados de marzo, fecha en la cual la mayoría de los montes de manzano

evaluados fueron o estaban siendo cosechados, indicando el fin de la temporada.

Los resultados muestran que ambos emisores duran toda la temporada productiva con niveles de emisión de feromonas bastante estables hasta los 90 días, a partir de allí la pérdida de peso disminuye lentamente (Figura 15).

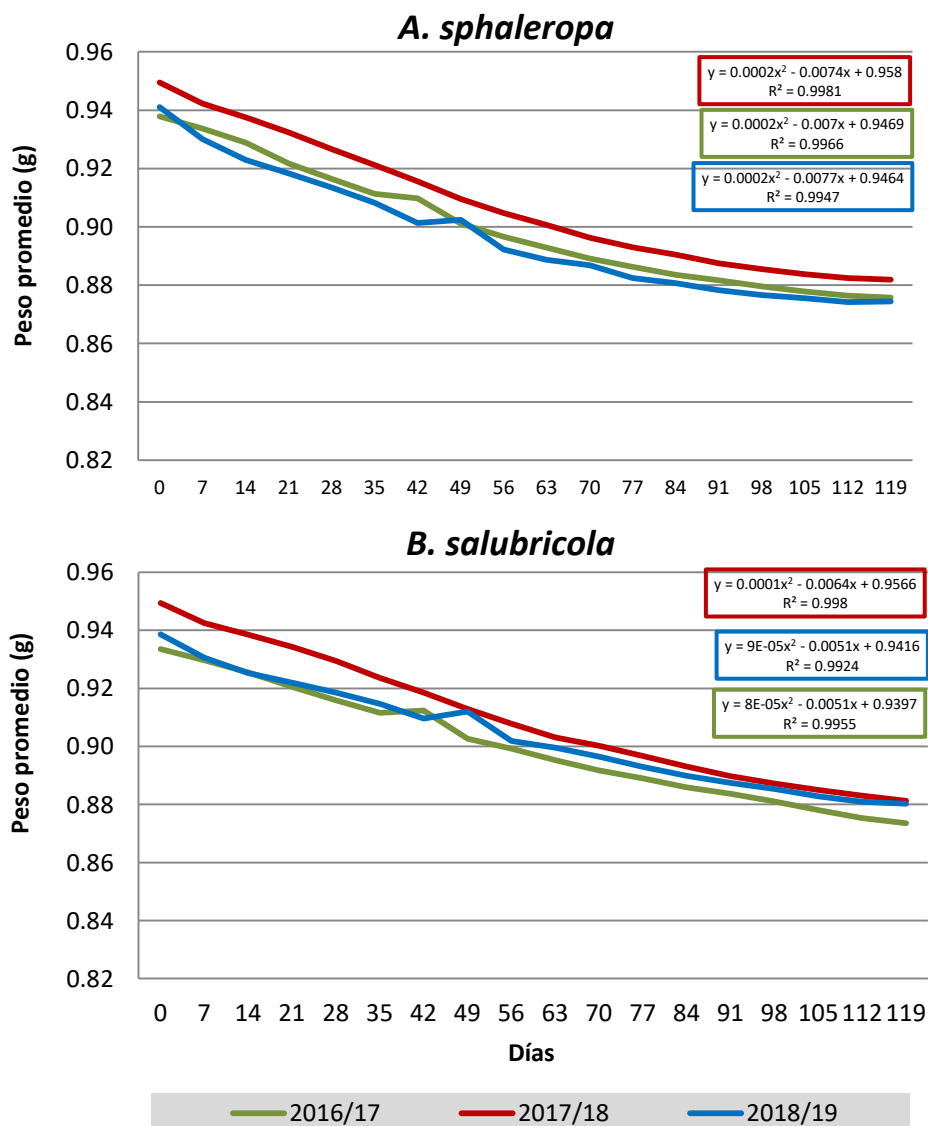


Figura 15. Peso promedio semanal de 12 emisores de feromona de *Argyrotaenia spheropa* y de *Bonagota salubricola* para los tres años evaluados.

El peso de los emisores a lo largo del período estuvo bien representado por la función cuadrática, lo que resultó en modelos significativos con coeficientes de determinación superiores a 0,99 tanto para los emisores de ambas especies como para los distintos años (Cuadro 6).

En los casos puntuales donde los datos observados presentan un incremento de peso, el caso del día 42 de la temporada 2016/17 y día 49 de la del 2018/19, coinciden con la fecha de registro del peso de los emisores luego de un episodio de lluvia y por estar húmedos tuvieron un peso mayor, que al siguiente registro se vuelve a estabilizar (Idem para figura 16).

En la figura 16 se aprecian los ajustes del modelo en base a los datos observados (puntos azules) y los intervalos de predicción del modelo (líneas externas negras) para cada especie en cada año.

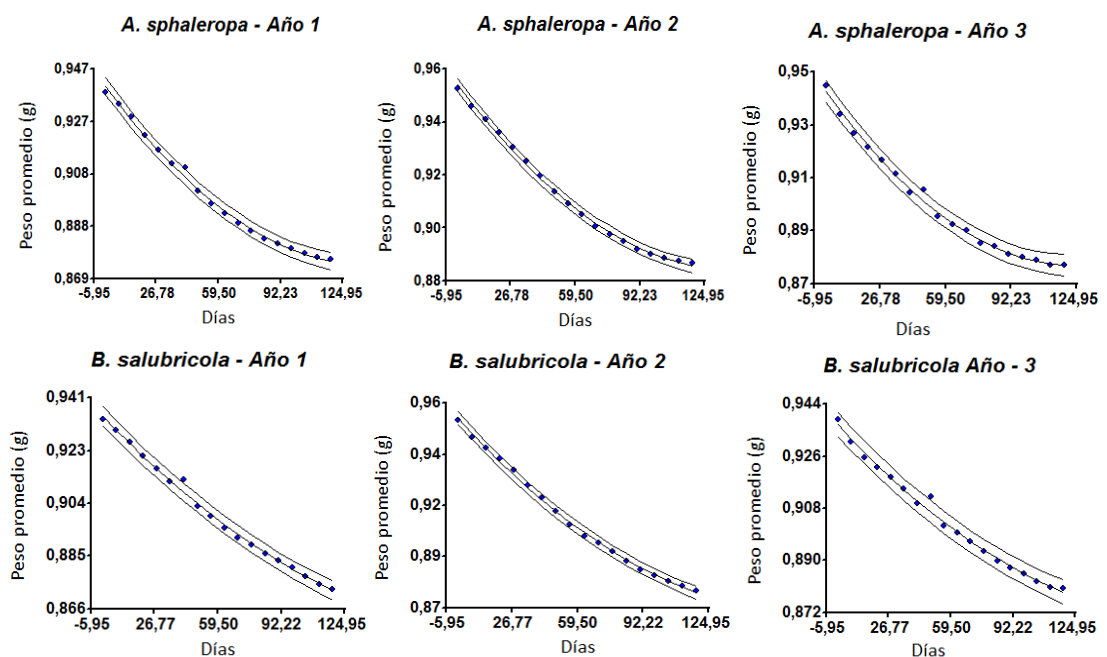


Figura 16. Ajuste del modelo cuadrático para los datos de peso promedio de emisores (puntos azules) y los intervalos de predicción (líneas externas negras) para cada especie en cada año ($P < 0,0001$).

El modelo propuesto se ajustó perfectamente, quedando la totalidad de los valores observados dentro de los límites de predicción del mismo.

Se determinó también el número de días en el que se alcanza el peso mínimo del emisor en el campo (agotamiento de feromonas) estimado por el modelo. El tiempo de agotamiento (días) fue estimado a partir de la derivada primera [$-\beta_1 / 2\beta_2 = 0$] de cada función ajustada por especie y por año (Cuadro 6). El mínimo peso alcanzado debería coincidir con el agotamiento del contenido de feromona de los mismos.

Los resultados muestran que los mínimos de la función caen fuera de la zona de definición del modelo, excepto para *A. sphaleropa* en el año 3. Si bien los días estimados en los que se alcanza el peso mínimo de los emisores se exceden de la zona de definición del modelo propuesto, sí confirman que los emisores tienen una duración de al menos 119 días, permitiendo cubrir toda la temporada productiva.

No puede afirmarse, que el peso alcanzado por los emisores al final de cada temporada, que evidencia el contenido de feromona restante de los mismos, sea suficiente para evitar el encuentro entre macho y hembra, dado que no existen antecedentes de uso de estas feromonas ni valores estándar con los cuales comparar.

Sin embargo, si tomamos como referencia el ensayo de apareamiento de adultos de *A. sphaleropa* en jaulas, llevado a cabo con fecha promedio del día 103 del año 2018/19, a esta fecha el porcentaje de feromona remanente era de un 3,2%, equivalente a un peso promedio de emisor de 0,8755 g. A pesar de no tener datos de referencia para comparar, según los resultados obtenidos (Cuadro 6), este contenido de feromona pareció ser suficiente para disminuir el porcentaje de apareamiento de esta especie, lo que permitiría afirmar que los emisores llegarían al final de la temporada con un contenido aceptable de feromona.

La variación reflejada entre la duración máxima en días y el peso mínimo (g) de los emisores al día 119 entre los distintos años, se debió básicamente a la carga inicial de feromona de cada emisor y a las

características climáticas de cada temporada, principalmente en lo que respecta a la temperatura y la ocurrencia de lluvias, ambos procesos que influyen en la tasa de liberación de la feromona (Figura 17) (Witzgall et al., 2010). A su vez, las diferencias entre especies se deben al comportamiento y estabilidad de los componentes químicos que integran cada formulación de feromona.

Cuadro 6. Parámetros de regresión cuadrática [β_2 , β_1 y β_0] y coeficiente de determinación (R^2) para el peso del emisor en función del tiempo (x , días), por especie y año.

Especie	Año	β_0	β_1	$\beta_2 \times 10^{-6}$	R^2	Días
<i>Argyrotaenia sphaleropa</i>	2016/17	0,94	- 0,0095	3,4	0,9966	139
	2017/18	0,95	- 0,001	3,6	0,9981	139
	2018/19	0,94	- 0,001	4,2	0,9947	119
<i>Bonagota salubricola</i>	2016/17	0,93	- 0,00071	1,6	0,9955	222
	2017/18	0,95	- 0,00089	2,5	0,9980	178
	2018/19	0,94	- 0,0007	1,8	0,9924	194

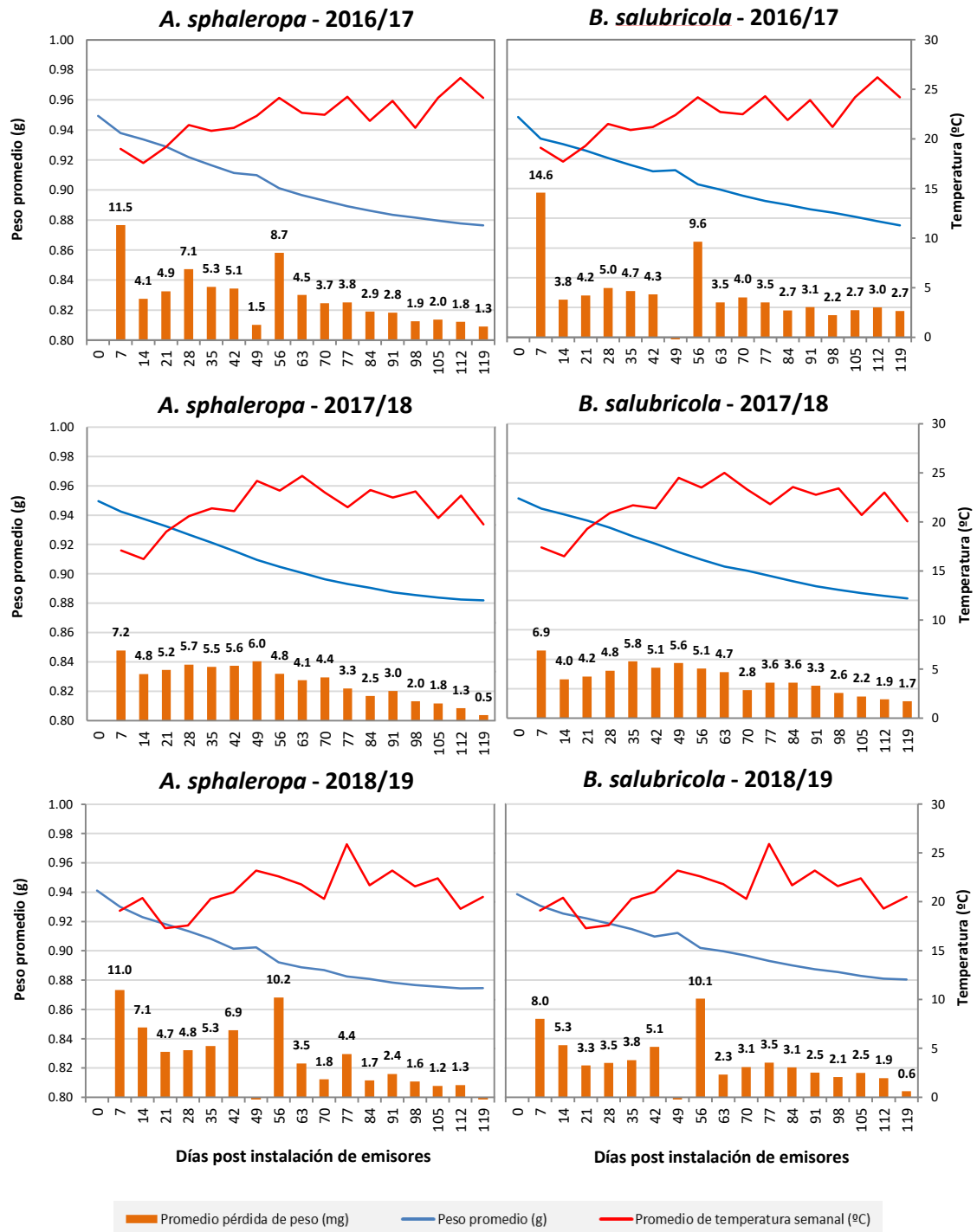


Figura 17. Peso promedio (g) y pérdida de peso promedio (mg) de los emisores de *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota salubricola* en relación con la temperatura media semanal, para los tres años de estudio.

En la gráfica se aprecia como la temperatura tiene influencia en la magnitud de la emisión de la feromona, visible a través de la pérdida de peso (mg) de los emisores. En todos los años ocurre una gran pérdida inicial de peso en la primera medición, por motivo de que los emisores venían sellados al vacío y refrigerados, y al instalarlos en el campo la diferencia de temperatura provoca una rápida emisión de la feromona. Luego la pérdida de peso se estabiliza y lo se puede observar es cierta tendencia a que los valores más altos de disminución de peso de los emisores generalmente coincidan con los picos de mayor temperatura media semanal.

4. CONCLUSIONES

La eficacia del método de confusión sexual para *A. sphaeropa* y *B. salubricola* quedó demostrada al registrarse el completo silenciamiento de las trampas, la disminución en la tasa de apareamiento de adultos de *A. sphaeropa* y la adecuada duración de los emisores de feromona en el campo. A pesar de que la eficacia real de la técnica, medida a través de la estimación del daño en frutos, reveló una mayor variabilidad en los resultados, registrando porcentajes de daño que superaron algunas veces el 1%, al no encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos podemos afirmar que la técnica de confusión sexual obtuvo resultados similares al método de control químico. Sin embargo, la gran diferencia radica en que ante similares niveles de descarte de frutos ocasionados por estas plagas, el uso de confusión sexual tiene amplias ventajas. Desde el punto de vista ambiental su empleo no genera ningún tipo de contaminación ni tampoco efectos adversos en la fauna benéfica; al ser también una sustancia inocua no afecta negativamente la salud del trabajador rural ni la del consumidor final. Un aspecto muy alentador a destacar es que los emisores de feromona de ambas especies duraron toda la temporada productiva no habiendo necesidad de reemplazarlos. Esto implica que el productor deba incurrir en costos de compra e instalación una única vez al año, haciendo que la adopción de la técnica sea factible.

Para que sea posible la implementación de la técnica de confusión sexual para *A. sphaeropa* y *B. salubricola* en un futuro cercano, sería necesario una evaluación de la misma en un área extensa que contemple las condiciones propias de una zona frutícola involucrando a más productores y mayor diversidad de especies y variedades de frutales. En sí, sería aplicar un procedimiento similar al que se realizó para lograr el registro y la disponibilidad comercial de los diversos formatos de emisores de confusión sexual para *Cydia pomonella* y *Grapholita molesta*.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Bavaresco A, Núñez S, García M, Botton M, Sant´Ana J. 2005. Atração de machos da lagarta-das- fruteiras *Argyrotaenia spheropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) aos componentes do feromônio sexual sintético na cultura do caqui. *Neotropical Entomology*, 34(4), 619-625.
- Bentancourt CM, Scatoni IB. 2010. Guía de Insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Montevideo (UY): Udelar. Facultad de Agronomía. Editorial Hemisferio Sur. 582 p.
- Bentancourt CM, Scatoni IB, Morelli E. 2009. Insectos del Uruguay. Montevideo (UY): Udelar. Facultad de Agronomía-Facultad de Ciencias. 658p.
- Bentancourt CM, Scatoni IB. 2006. Lepidópteros de importancia económica en Uruguay. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. Segunda edición. Montevideo (UY): Udelar. Facultad de Agronomía. Editorial Hemisferio Sur. 437 p.
- Bentancourt CM, Scatoni IB. 2002. Identificación de larvas y crisálidas de *Argyrotaenia spheropa* (Meyrick) y *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae). *Agrociencia*, 5(2), 83-86.
- Bentancourt CM, Scatoni IB. 1986. Biología de *Argyrotaenia spheropa* Meyrick (1909) (Lep.Tortricidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Brasileira de Biología*, 46(1), 209-216.

- Biezanko CM, Ruffinelli A, Carbonell CS. 1957. Lepidópteros del Uruguay. Revista de la Facultad de Agronomía (Uruguay,) 46, 1-152.
- Botton M, Nakano O, Kovaleski A. 2000. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações de *Bonagota cranaodes* (Meyrick)(Lepidoptera: Tortricidae) em regiões produtoras de maçã do sul do Brasil. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 29, 633-637.
- Briand F, Guerin PM, Charmillot PJ, Kehrlí P. 2012. Small cages with insect couples provide a simple method for a preliminary assessment of mating disruption. The Scientific World Journal. Volume 2012, 8p.
- Butenandt A. 1959. Wirkstoffe des Insektenveiches. Naturwissenschaften 46(15), 461–471.
- Cardé RT, Minks AK. 1995. Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. Annual Review of Entomology, 40(1), 559-585.
- Coracini MDA, Zarbin PH, Bengtsson M, Kovaleski A, Vilela EF, Torezan LL, ER Hickel, Witzgall P. 2007. Effects of photoperiod and temperature on the development of *Bonagota cranaodes*. Physiological Entomology, 32(4), 394-398.
- Coracini MDA, Bengtsson M, Reckziegel A, Eiras AE, Vilela EF, Anderson P, Francke W, Lofqvist J, Witzgall P. 2003. Behavioural effects of minor sex pheromone components in Brazilian apple leafroller *Bonagota cranaodes* (Lep., Tortricidae). Journal of applied entomology, 127(7), 427-434.

- Coracini MDA, Bengtsson M, Reckziegel A, Löfqvist J, Francke W, Vilela EF, Eiras AE, Kovaleski A, Witzgall P. 2001. Identification of a four-component sex pheromone blend in *Bonagota cranaodes* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of economic entomology*, 94(4), 911-914.
- De Lame FM, Gut LJ. 2006. Effect of monitoring trap and mating disruption dispenser application heights on captures of male *Grapholita molesta* (Busck; Lepidoptera: Tortricidae) in pheromone and virgin female-baited traps. *Environmental Entomology*, 35 (4), 1058-1068.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2017. InfoStat versión 2017. Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. Centro de Transferencia InfoStat, FCA. [En línea]: 20 de agosto de 2019. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Di Rienzo J.A, Guzman AW, Casanoves F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*. 7 (2), 129–142.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2019. Producción [En línea]. En: Anuario estadístico agropecuario 2019. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 14 de marzo de 2020. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf>.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2018. Producción Vegetal [En línea]. En: Anuario estadístico agropecuario 2018. Montevideo:

MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 20 de febrero de 2020. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario2018.pdf>.

DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2016. Producción Frutícola [En línea]. En: Encuesta frutícola de hoja caduca zafra 2016. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 1º de marzo de 2020. Disponible en: https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agriculturapesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-02/encuesta_fruticola_de_hoja_caduca_zafra_2016_1.pdf.

DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2012. Producción Frutícola, Valor bruto de la producción (VBP) [En línea]. En: Encuesta frutícola de hoja caduca zafra 2011/2012. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 1º de marzo de 2020. Disponible en: https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-02/encuesta_fruticola_de_hoja_caduca_-_zafra_201112_no_308.pdf

DIGEGRA (Dirección General de la Granja). 2020. Aplicaciones [En línea]. En: Registro Nacional Frutihortícola. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado abril 2020. Disponible en: <https://www.mgap.gub.uy/Frutihorti/>.

Eiras AE, Kovaleski A, Vilele EF, Chambon JP, Unelius CR, Borg-Karlson AK, Liblikas I, Mozuraitis R, Bengtsson M, Witzgall P. 1999. Sex pheromone of the Brazilian apple leafroller, *Bonagota cranaodes* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae). Zeitschrift fur Naturforschung C- A Journal of Biosciences. 54 (7-8), 595-601.

- González A, Altesor P, Sellanes C, Rossini C. 2012. Aplicación de feromonas sexuales en el manejo de lepidópteros plaga de cultivos agrícolas. Temas selectos en Ecología Química de Insectos. México. El Colegio de la Frontera Sur. 343-360.
- Guerrero A, Lopez S, Álvarez Calero J, Quero C. 2020. Feromonas de insectos: técnicas para su aislamiento y caracterización. Sociedad Española de Entomología Aplicada. Boletín N° 5, 17-26.
- Heguaburu V, Rasquin K, Martínez V, González A, Scatoni IB. 2019. Producción y evaluación de feromonas sexuales para el control de tortricidos nativos (Lepidoptera: Tortricidae) en frutales de pepita. Montevideo, INIA Serie FPTA 83, 40 p.
- Herrera AJM. 2011. Primera experiencia a nivel mundial del Manejo Integrado de Plagas: el caso del algodón en el Perú. Revista Peruana de Entomología, 46(1), 1–8.
- Hoshi H, Takabe M, Nakamura K. 2016. Mating disruption of a carpenter moth, *Cossus insularis* (Lepidoptera: Cossidae) in apple orchards with synthetic sex pheromone, and registration of the pheromone as an agrochemical. Journal of Chemical Ecology, 42(7), 606-611.
- Howse PE. 1998. Pheromones and Behaviour. En: Howse PE, Stevens IDR, Jones OT. (Eds.). Insect Pheromones and their Use in Pest Management. Londres: Chapman and Hall. 1–130.
- INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY). 2019. Temperatura máxima (°C), temperatura media (°C) y temperatura mínima (°C). Estación Las Brujas (en línea). Montevideo s.p.

Consultado julio 2019. Disponible en:
<http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico/>

Karlson P, Lüscher M. 1959. 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, (183), 55–56.

Legrand S, Botton M, Coracini M, Witzgall P, Unelius CR. 2004. Synthesis and field tests of sex pheromone components of the leafroller *Argyrotaenia sphaleropa*. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 59(9-10), 708-712. Doi: 10.1515/znc-2004-9-1016.

Manfredi-Coimbra S, García M, Botton M. 2001. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae). *Neotropical Entomology*, 30(4), 553 – 557. Doi: 10.1590/S1519-566X2001000400007.

Meneguim AM, Hohmann CL. 2007. *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) in Citrus in the State of Paraná, Brazil. *Neotropical Entomology*, 36(2), 317-319. Doi: 10.1590/s1519-566x2007000200023.

Miller JR, Gut LJ, de Lamé FM, Stelinski LL. 2006. Differentiation of competitive vs. noncompetitive mechanisms mediating disruption of moth sexual communication by point sources of sex pheromone: (Part 1) Theory. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 2089-2114. Doi: 10.1007/s10886-006-9134-8.

Miller JR, Gut LJ. 2015. Mating disruption for the 21st century: matching technology with mechanism. *Environmental Entomology*, 44, 427-443.

- Mochizuki F, Fukumoto T, Noguchi H, Sugie H, Morimoto T, Ohtani K. 2002. Resistance to mating disruptant composed of (Z)-11-tetradecenyl acetate in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Yasuda) (Lepidoptera: Tortricidae). *Applied Entomology and Zoology*, 37, 299–304.
- Morandi-Filho WJ, Botton M, Grützmacher AD, Núñez, S. 2007. Flutuação populacional de *Argyrotaenia spheropa* (Meyrick, 1909) (Lep:Tortricidae) com emprego de feromônio sexual sintético na cultura da videira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29(2), 213-216.
- Núñez S, Scatoni I. 2013. Tecnología disponible para el manejo de plagas en frutales de hoja caduca. Serie Técnica INIA, N° 210. Montevideo, 150p.
- Núñez S, Scatoni I, Duarte F, Croce C, Carbone F. Manejo regional de plagas en frutales. 2012. In: INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria); Programa Nacional de Producción Frutícola. Frutales de pepita. Seminario de actualización técnica. Canelones (UY): INIA Las Brujas. p. 51-68. (INIA Serie Actividades de Difusión; 687).
- Núñez S, de Vlieger JJ, Rodríguez CJ, Persoons J, Scatoni IB. 2002. Sex pheromone of South American tortricid moth *Argyrotaenia spheropa*. *Journal of Chemical Ecology*, 28(2), 425-432.
- Núñez S. 1999. Evaluación del método de confusión sexual y aplicación reducida de insecticidas para el control de carpocasca y lagartitas de manzano. INIA. Actividades de difusión n° 204. Reunion técnica sobre resultados experimentales en protección vegetal en frutales y vid.

- Núñez S, García S, Paullier J, Pagani C, Maeso D. 1998. Guía para el manejo integrado de plagas y enfermedades en frutales. Montevideo: INIA. (Boletín de Divulgación, N°66). 116 p.
- Pastori PL, Arioli CJ, Botton M, Bittencourt Monteiro L, Stoltman L, Mafra-Neto L. 2012. Integrated control of two tortricid (Lepidoptera) pests in apple orchards with sex pheromones and insecticides. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(2), 224-230.
- Porcel M, Sjöberg P, Swiergiel W, Dinwiddie R, Rämert B, Tasin M. 2014. Mating disruption of *Spilonota ocellana* and other apple orchard tortricids using a multispecies reservoir dispenser. *Pest management science*, 71(4), 562-570.
- Ruffinelli A, Carbonell CS. 1953. Segunda lista de insectos y otros artrópodos de importancia económica del Uruguay. *Revista de la Asociación de Ingenieros Agrónomos del Uruguay*, 94, 33-82.
- Scatoni I, Calvo M, Duarte F, Borges A. 2011. Caracterización espacial de los lepidópteros plaga de los frutales de pepita en la zona sur de Uruguay. Montevideo, INIA Serie FPTA 31, 48p.
- Sellanes MC. 2011. Aspectos químicos y biológicos de la comunicación química en *Cryptoblabes gnidiella* (Lepidoptera: Pyralidae). Tesis de Maestría en Química. Montevideo, Uruguay. Facultad de Química. 119p.
- Shorey HH, Hale RL. 1965. Mass rearing of the larvae of nine noctuid moth species on a simple artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 58(3), 522–524.

- Stelinski LL, McGhee P, Grieshop M, Brunner J, Gut LJ. 2008. Efficacy and mode of action of female equivalent dispensers of pheromone for mating disruption of codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Agricultural and Forest Entomology*, 10, 389–397.
- Trematerra P, Colacci M, Athanassiou CG, Kavallieratos NG, Rumbos CI, Boukouvala MC, Nikolaidou AJ, Kontodimas DC, Benavent-Fernández E, Gálvez-Settier S. 2019. Evaluation of mating disruption for the control of *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) in suburban recreational areas in Italy and Greece. *Journal of Economic Entomology*, 112(5), 2229-2235.
- Unelius CR, Eiras A, Witzgall P, Marie Bengtsson M, Kovaleski A, Viliela EF, Borg Karlson AK. 1996. Identification and synthesis of the sex pheromone of *Phtheochroa cranaodes* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae), *Tetrahedron Letters*, 37(9), 1505-1508.
- Witzgall P, Kirsch P, Cork A. 2010. Sex pheromone and their impact on pest management. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 80-100.
- Witzgall P, Stelinski L, Gut L, Thomson D. 2008. Codling moth management and chemical ecology. *Annual Review of Entomology*, 53, 503-522. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093323.
- Zoppolo R, Scatoni I, Duarte F, Mujica MV, Gabard Z. 2016. Area-wide pest management in deciduous fruits of southern Uruguay. *Acta Horticulturae*, 1137, 153–160.

6. ANEXOS

6.1 MATERIAL SUPLEMENTARIO

Aplicaciones de insecticidas, con efecto directo o indirecto sobre las lagartitas, que fueron realizadas en las parcelas del control convencional para los tres sitios de estudio durante la temporada 2017/18.

Predio	Fecha de aplicación	Ingrediente activo	Ingrediente activo ha ¹
1	14 de octubre	pyriproxifen	15 cc
	13 de diciembre	metoxifenocide	150 cc
2	13 de octubre	novaluron	150 cc
	7 de diciembre	metoxifenocide ²	150 cc
	27 de diciembre	cipermetrina	75 cc
	18 de enero	matrine	75 cc
	13 de febrero	cipermetrina	75 cc
3	23 de febrero	cipermetrina	75 cc
	18 de diciembre	metoxifenocide	150 cc
	26 de enero	Deltametrina	15 cc
	30 de enero	malathion	300 cc
	10 de febrero	fosmet	1500 gr
20 de febrero	malathion	300 cc	

² Aplicación realizada también en la parcela de confusión sexual, excepto en el área destinada al muestreo exhaustivo de frutos.

Aplicaciones de insecticidas, con efecto directo o indirecto sobre las lagartitas, que fueron realizadas en las parcelas del control convencional para los tres sitios de estudio durante la temporada 2018/19.

Predio	Fecha de aplicación	Ingrediente activo	Ingrediente activo ha¹
1	10 de octubre	metoxifenocide	150 cc
	19 de octubre	metoxifenocide	150 cc
	4 de enero	deltametrina	15 cc
	31 de enero	deltametrina	15 cc
	2 de marzo	deltametrina	15 cc
2	21 de febrero	spinosinas A and D	110 cc
3	22 de diciembre		
	2 de enero		
	21 de enero	metoxifenocide	150 cc
	7 de febrero		
	26 de febrero		

6.2. MATING DISRUPTION OF NATIVE LEAFROLLERS IN APPLE ORCHARDS UNDER AREA-WIDE PEST MANAGEMENT OF CODLING MOTH AND ORIENTAL FRUIT MOTH.³

Running Title: Mating disruption of *Argyrotaenia sphaleropa* and *Bonagota salubricola*.

Valentina Martínez^{1*}, Viviana Huguaburu², Alejandra Borges³, Iris Scatoni¹ y
Andrés González⁴

¹ Universidad de la República Oriental del Uruguay, Facultad de Agronomía, Departamento de Protección Vegetal, Unidad de Entomología. Av. Garzón 780. Montevideo, 12900, Uruguay.

² Universidad de la República Oriental del Uruguay, Centro Universitario Regional Norte, Departamento de Química del Litoral. Ruta 3 km 363. Paysandú, 60000, Uruguay.

³ Universidad de la República Oriental del Uruguay, Facultad de Agronomía, Departamento de Biometría, Estadística y Cómputos. Av. Garzón 780. Montevideo, 12900, Uruguay.

⁴ Universidad de la República Oriental del Uruguay, Facultad de Química, Laboratorio de Ecología Química. Av. Gral. Flores 2124. Montevideo, 11800, Uruguay.

Mention of commercial products in this publication is solely for the purpose of reporting research findings and does not imply a recommendation or endorsement by the Universidad de la República Oriental del Uruguay.

*Correspondence to: Valentina Martínez, email: valems11892@gmail.com.uy

Abstract

³ Artículo presentado para ser publicado en Pest Management Science

BACKGROUND: The leafrollers *Argyrotaenia spheropa* and *Bonagota salubricola* (Lepidoptera: Tortricidae), are important native pests of pome fruit in southern South America. After the successful implementation of the mating disruption (MD) technique for the cosmopolitan pests *Cydia pomonella* (CM) and *Grapholita molesta* (OFM), it seemed feasible and desirable to replace the current insecticide-based management of the native leafrollers with MD as well. The aim of this research was to evaluate the MD technique for *A. spheropa* and *B. salubricola* in commercial apple orchards, managed with MD for CM and OFM, in southern Uruguay. Using rope pheromone dispensers, a combined surface of 12 há in three plots were treated with MD in two consecutive seasons. Similar plots under insecticide management for leafrollers were used as control. Pheromone trap catches, fruit damage and mating rates in caged couples were measured throughout the two seasons. To assess dispenser durability, release rates of both pheromones were determined by gravimetric analyses under field conditions.

RESULTS: Captures of *A. spheropa* and *B. salubricola* males in monitoring traps were virtually absent in mating disruption plots, compared to abundant captures in control plots. Even though no insecticide treatments were applied for leafroller control in the MD-treated plots, no significant differences were found in fruit damage between MD-treatments and control plots. Mating rates in *A. spheropa* were significantly lower in the MD-treated plot. Pheromone rope dispensers lasted for the entire season with stable pheromone emission levels, making unnecessary the dispenser reapplication.

CONCLUSIONS: The mating disruption technique for *A. spheropa* and *B. salubricola* resulted in comparable control levels with respect to insecticides, with the advantage of not posing harmful effects on human health and the environment.

Key words: pome fruit trees, South American tortricid moth, Brazilian apple leafroller, mating disruption

1 INTRODUCTION

Mating disruption with synthetic sex pheromones has long been regarded as a viable and attractive alternative for the sustainable control of lepidopteran pests.¹ In mating disruption, synthetic pheromone is released in a treated area in order to interfere with the orientation of males toward calling females, thus reducing mate finding and the next generation of the pest.² Among the best known examples of successful use of mating disruption in crop protection is the control of the codling moth (CM) (*Cydia pomonella* L., Lepidoptera: Tortricidae) and the oriental fruit moth (OFM) (*Grapholita molesta* L. Busck, Lepidoptera: Tortricidae) in pome and stone fruit orchards.^{3,4,5,6,7,8,9}

Since its early days, one of the limitations for the implementation of mating disruption has been the outbreak of secondary pests due to reduced insecticide use. Particularly, native leafrollers previously controlled by broad-spectrum insecticides can become serious pests during and after the transition to mating disruption for primary pests.^{10,11,12} This problem has been a challenge for the implementation of mating disruption for the control of CM and OFM in southern Brazil and Uruguay, especially due to two leafrollers once regarded as secondary pests, *Argyrotaenia spheropa* (Meyrick) and *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae).

Commonly known as the South American tortricid moth and the Brazilian apple leafroller, respectively, *A. spheropa* and *B. salubricola* have been reported in Uruguay, Argentina and Brazil, as well as in Bolivia and Perú in the case of *A. spheropa*.¹³ The larvae are polyphagous and can feed on all grape berries, apples, pears and stone fruits, along with several shrubs and weeds of various families.¹³ Both species develop continuously throughout the year with year-around availability of hosts.^{14,15} The larvae are primarily found in tree buds where they feed on young leaves. Occasionally they move to the developing fruits, and contrarily to CM and OFM, they do not penetrate the fruit but cause irregular and superficial skin tunnels that decrease the fruit

commercial value.¹³ The damage symptoms of *A. sphaleropa* and *B. salubricola* cannot be differentiated in the field, so the assessment of fruit damage may produce confusing results in regions in which the two species co-occur.

In Uruguay, the application of mating disruption for CM and OFM in commercial apple and pear orchards showed early promise as it considerably reduced seasonal pheromone trap catches and insecticide applications.^{16,17,18} After a slow transition, nowadays 90% of the area planted with pome and stone fruit trees are under mating disruption for CM and/or OFM.¹⁹ As a consequence of the widespread adoption of mating disruption, and in conjunction with the decreased use of broad-spectrum insecticides, *A. sphaleropa* and *B. salubricola* have become of great economic impact.^{13,18} Indeed, most of the insecticide applications currently applied in apple and pear orchards in Uruguay specifically target these two leafrollers.¹⁹ Insecticide applications for the control of *A. sphaleropa* and *B. salubricola* relies on an established threshold of adult catches in pheromone traps. Nevertheless, chemical control is proving insufficient and harmful for the environment and human health¹⁸, so more sustainable methods to be used in conjunction with mating disruption for CM and OFM must be devised. The sex pheromones of *A. sphaleropa* and *B. salubricola* are well known. In the case of *B. salubricola*, the pheromone contains E3,Z5-12:Ac as a major component and two minor components: Z9-16:Ac and Z5-12:Ac in proportions 8:1:1, respectively.^{20,21} The pheromone of *A. sphaleropa* is composed of Z11,13-14:Ald, Z11-14:Ald and the corresponding acetates, in a relative ratio of 4:1:40:10.^{22,23,24,25}

The sex pheromone of *B. salubricola* has been readily available in the market for monitoring purposes. Moreover, mating disruption for *B. salubricola* was evaluated in Brazil in combination with OFM, with promising results.²⁶ The sex pheromone of *A. sphaleropa* is not commercially available and has been synthesized in laboratory scale in Uruguay. This has allowed local growers to access monitoring traps and researchers to test alternative control strategies

such as attract and kill.²⁷ However, the larger scale needed for mating disruption has not been available thus far.²⁸

Through collaboration with Shin-Etsu Chemical Co. of Japan, we have now been able to simultaneously evaluate the mating disruption method for *A. sphaleropa* and *B. salubricola* in commercial apple orchards in Uruguay. The experiments were conducted in two consecutive years in large-scale orchards managed by mating disruption for CM and OFM. The effectiveness of mating disruption for both leafrollers was assessed from adult catches in monitoring traps and fruit damage throughout the growing season, in comparison with control orchards managed with chemical control for leafrollers. Copulation rates in caged couples were also evaluated for both leafrollers in treated and control plots.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental sites

The trials were conducted from spring 2017 to fall 2019 in three commercial apple orchards in the locality of Melilla (Montevideo, Uruguay), where damage by leafrollers had been detected in previous years (Table S1, Figure S1). A randomized complete block design was used for all years, considering each site as a block. The orchards are installed in high density with 3.7 to 4 meters between rows and 1 meter between plants. The age of the trees range between 10-12 years. In each site, two 3-4 Ha plots separated by a minimum of 200 m were defined for the MD treatment and conventional control. The treatments were assigned to the plots so that the prevailing winds of the growing season did not cause pheromone drift from the MD treatment towards the control. The plots were assigned the same treatment in the two consecutive years of the study, in all three sites.

Apple varieties in the MD-treated and control plots were mostly the same in each orchard (Table S1). If not the same, the varieties were harvested at the same time. There was no lepidopteran control with insecticides during the

entire experimental period in the MD-treated plots. The conventional control plots were managed with insecticides for leafrollers if more than 20 adults of *A. sphaleropa* and/or *B. salubricola* were captured in pheromone traps on a weekly basis. All plots were managed with MD for CM and OFM with ISOMATE® CTT and ISOMATE® OFMTT dispensers (500 and 250 dispenser/ha, respectively).

2.2 Application of mating disruption

Rope MD dispensers made of polyethylene were provided as experimental batches by Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japan). Dispensers contained 100 mg of the active ingredient mixture, and were prepared separate for each species: [*A. sphaleropa*: Z11,13-14Ald; Z11,13-14; Ac Z11-14Ald; Z11-14Ac (85:5:5:5 ratio); *B. salubricola*: E3Z5-12Ac; Z9-16Ac; E3Z5-14Ac; Z5-12Ac (47.6:47.6:2.4:2.4 ratio)]. The dispensers were installed manually in the mating disruption plots with a density of 500 dispensers per hectare, corresponding to 50 g/ha of pheromone. The dispensers were distributed evenly in the inside of the plot, with higher density in edges. They were tied to branches in the upper third of the trees, avoiding direct incidence of the sun. The dispensers were deployed from early November until late March. The installation dates were decided from captures in monitoring traps installed between October 6th and 13th for both leafrollers.

2.3 Evaluation of Mating Disruption

The efficacy of mating disruption for *A. sphaleropa* and *B. salubricola* was assessed three ways: by the capture of male adults in pheromone traps (trap silencing), by the evaluation of damages in fruits throughout the season, and by mating rates of caged adults. Additionally, pheromone release rates were measured under field conditions to assess dispenser durability and the eventual need for dispenser reinstallation.

For male monitoring, twenty-four delta traps (PHEROCON® VI Trap) were installed in each plot in all three sites. Half of the traps targeted *A.*

sphaleropa males and were baited with rubber septa impregnated with 1 mg of a mixture of BHT: Z11,13-14Ac: Z11,13-14Ald: Z11-14Ald (9:4:4:1). The other half contained commercial septa for *B. salubricola* (ISCA Technology). The traps were hung in the upper third of the plants and distributed in the centre and edge of the plots. They were inspected weekly and the septa replaced every 30 and 60 days for *A. sphaleropa* and *B. salubricola*, respectively. The sticky bottoms were changed when necessary. Besides trap silencing due to male orientation disruption, male captures provided information to trigger chemical control in the conventional control plots (threshold: 20 adults/week).

Leafroller damage was assessed in MD and control plots by sampling 800 fruits from a delimited area of 0.5 has in each treatment plot in the three sites. Damage was recorded when irregular and superficial skin tunnels were observed. The sampling areas were planted with Red Delicious and were repeated in both seasons. To conduct the sampling, five of the fifteen rows within each sampling area were selected each month, then eight trees were randomly chosen per row and twenty apples were sampled per tree, hence reaching 800 fruits per month. Sampling was done once a month from January to March, selecting different rows on each sampling date.

Mating rates were evaluated in orchard #3 in February 2019, adapting procedures from similar studies.^{29,30} Virgin adults of *A. sphaleropa* y *B. salubricola* were obtained from laboratory rearings started from field-collected larvae. The rearings were maintained at 25°C and 70% relative humidity, under a 14:10 L:D photoperiod. The larvae were fed an artificial diet slightly modified from Shorey and Hale (1965).³¹ Upon pupation, the pupae were sexed and kept separate until adult emergence. One virgin female and one virgin male (1 day old) were enclosed in black mesh screen cages (0.61 x 0.36 x 0.36 m) that allowed the entrance of light and ventilation. The cages were hung from the branches of apple trees by a central handle. In subsequent days, the same number of cages was installed simultaneously in the center of mating disruption and control plots to control for environmental

factors that may affect mating (days with rainy forecast were avoided). The cages were hung in late afternoon for 24 h, after which the females were taken to the laboratory and placed individually in Petri dishes lined with wax paper. Mating was assessed by the laying of viable eggs that hatched into larvae. The experiment was completed by performing 22 replications for *A. sphaleropa* in each mating disruption and control plots, throughout one week. In the case of *B. salubricola*, only 5 repetitions could be completed due to insufficient virgin adults of the same age.

Pheromone release rates were assessed by gravimetric analyses to register the weight loss of the dispensers under field conditions. Starting in early November, briefly before dispenser instalment in the experimental orchards, 12 dispensers of each species were hung from apple trees located within our campus park, in order to access our laboratory analytical scale (KERN ADB, 0.1 mg resolution). The location was 10-15 km from the experimental sites, hence under the same environmental conditions. Individual dispensers were weighed on a weekly basis during the two experimental seasons.

2.4 Data analysis

To describe the population fluctuation and overall trap silencing, adult male captures in monitoring traps were plotted as the average number of males/trap/week as a function of the time. Male catches in each treatment, trap and year were accumulated throughout the season, and the average of 12 traps was used for a comparison between years and treatments, using a Generalized Linear Mixed Model (GLMM). Due to the over-dispersion of the data, a Quasi Poisson approach was used. Year, site, treatment and year per treatment interaction were included as fixed effects. The DGC multiple comparison method was used to separate treatment means.³² The percentage of damaged fruit for each year was analysed using GLMM assuming a binomial distribution, including treatment, sampling date and treatment*sampling date as fixed effects. Viable egg-laying data for *A. sphaleropa* were analyzed using the Mann Whitney-U test. Significance level

for all tests was 5%. The corresponding results for *B. salubricola* were not analyzed due to the low sample size. Data from pheromone release rates measurements were analysed by linear regression with weight as the response variable and time (days) as the independent variable, partitioning by year, according to the following model:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X_i + \beta_2 X_i^2 + \varepsilon_{ij}$$

Where Y_{ij} is the MD dispenser weight at time i for dispenser j , β_0 , β_1 and β_2 are the parameters of the quadratic model, X_i is time in days from November 13 and ε_{ij} are the residuals of the model at time i for dispenser j , assuming $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$, being σ_ε^2 the residual variance.

For each year and species, the first derivative of the resulting quadratic equation was calculated to determine the days from installation in which the dispensers reached their minimum weight (Days):

$$Days = -\frac{\beta_1}{2\beta_2}$$

All statistical analyses were done with Infostat software.³³

3 RESULTS

3.1 Monitoring traps

Captures of *A. sphaeropa* and *B. salubricola* males during October, before the installation of MD dispensers, showed that the initial populations were homogenous in the control and MD-treated plots in the three sites for the 2017-18 season (Table 1). In the second season, however, the initial populations of *A. sphaeropa* were lower in the MD-treated plots (Table 1), possibly as a result of the MD treatment in the previous season.

Table 1. *Argyrotaenia sphaleropa* and *Bonagota salubricola* male captures in pheromone traps prior to the installation of mating disruption dispensers. Each value represents the average cumulative captures of 12 traps in 3 weeks. Error terms indicate SEM.

Season	Site	<i>Argyrotaenia sphaleropa</i>			<i>Bonagota salubricola</i>		
		Control	Mating disruption	p-value	Control	Mating disruption	p-value
1	1	25.7 ± 5.3 A†	27.33 ± 5.1 A	0.582	1.6 ± 0.4 A	1.7 ± 0.7 A	0.547
	2	9.8 ± 1.5 A	8.33 ± 1.2 A	0.794	4.6 ± 1.3 A	4.0 ± 1.0 A	0.768
	3	17.1 ± 3.4 A	15.7 ± 2.3 A	0.728	2.0 ± 0.7 A	1.5 ± 0.5 A	0.699
2	1	6.3 ± 1.3 A	1.8 ± 0.6 B	0.001	1.2 ± 0.4 A	0 B	0.002
	2	6.7 ± 1.2 A	0.6 ± 0.3 B	0.0003	1.0 ± 0.3 A	0.3 ± 0.3 A	0.053
	3	23.0 ± 3.0 A	2.3 ± 1.1 B	<0.0001	0.3 ± 0.3 A	0 A	0.317

† Different letters indicate significant differences between future treatments for each species ($P < 0.05$).

After installation of MD, the silencing of monitoring traps was virtually complete for both species in the three sites and both seasons of study (Fig. 1). Male captures in traps located in the control plots showed the expected population fluctuations, with peaks between December and January. Captures in MD-treated plots, on the contrary, were almost absent after installing the dispensers in early November (Fig. 1). Male captures in control plots showed that both species showed higher populations in the 2018-19 season than in the previous one. Indeed, male captures exceeded the established threshold of 20 males/trap/week in the control plots (Fig. 1), which triggered applications for leafroller suppression in the control treatment plots (Table S2). Within each season, population densities showed variability among the three plots. Taking into account the cumulative captures per season, pest species and plot, it can be observed that *A. sphaleropa* was more abundant in Site 1 and 3, while *B. salubricola* was slightly more

abundant in Site 2. These trends were similar from one season to the next, even though overall captures increased in the second season (Fig. 2).

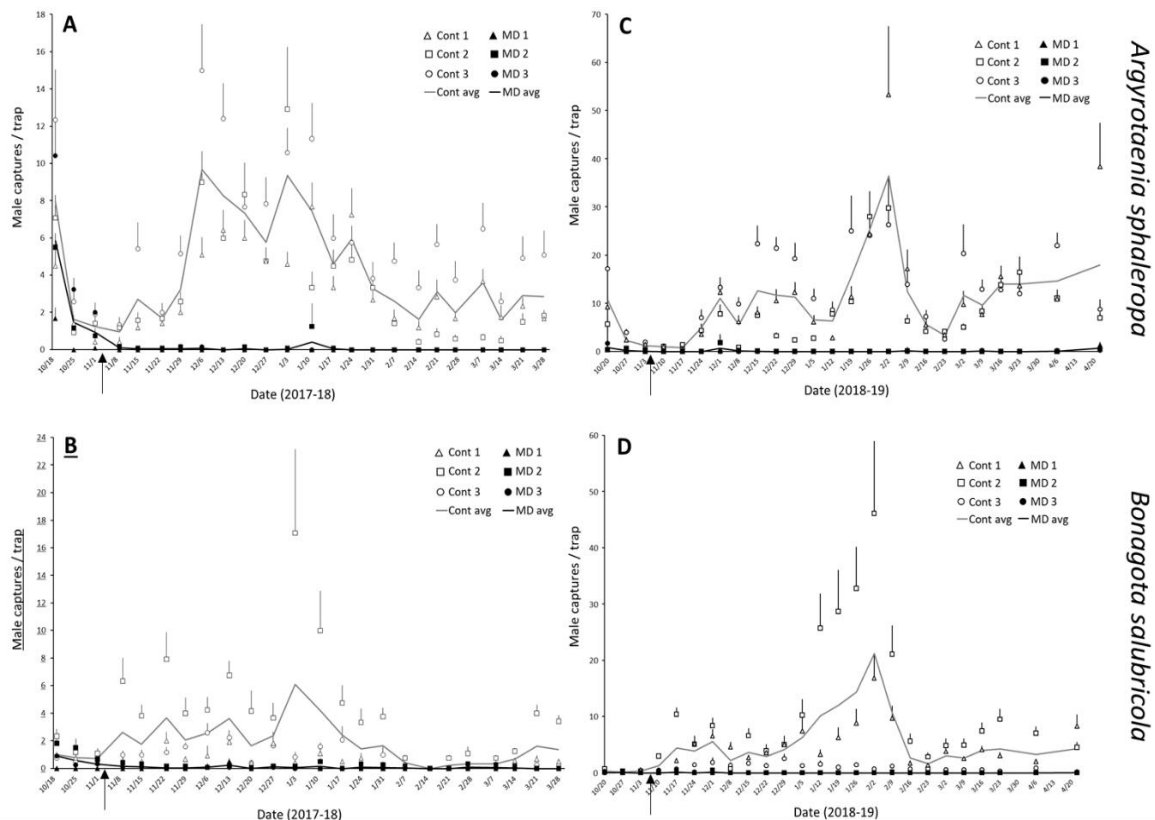


Figure 1. Average weekly male captures in monitoring traps in the control (grey line) and mating disruption (black line) plots. Open circles, squares and triangles show captures in control plots 1, 2 and 3, respectively. The corresponding black markers show captures in MD plots. Arrows indicate installment of MD dispensers. Each data point is an average of 12 traps. Vertical lines show SEM. **A:** *Argyrotaenia sphaleropa* 2017-18; **B:** *Bonagota salubricola* 2017-18; **C:** *Argyrotaenia sphaleropa* 2018-19; **D:** *Bonagota salubricola* 2018-19.

The average cumulative captures per leafroller species, treatment and season are compared in Table 2. In both seasons the control plots showed significantly higher cumulative captures than the mating disruption plots, with

significant more captures in the second season. The difference between seasons was reflected in the damage assessment as well, as shown below.

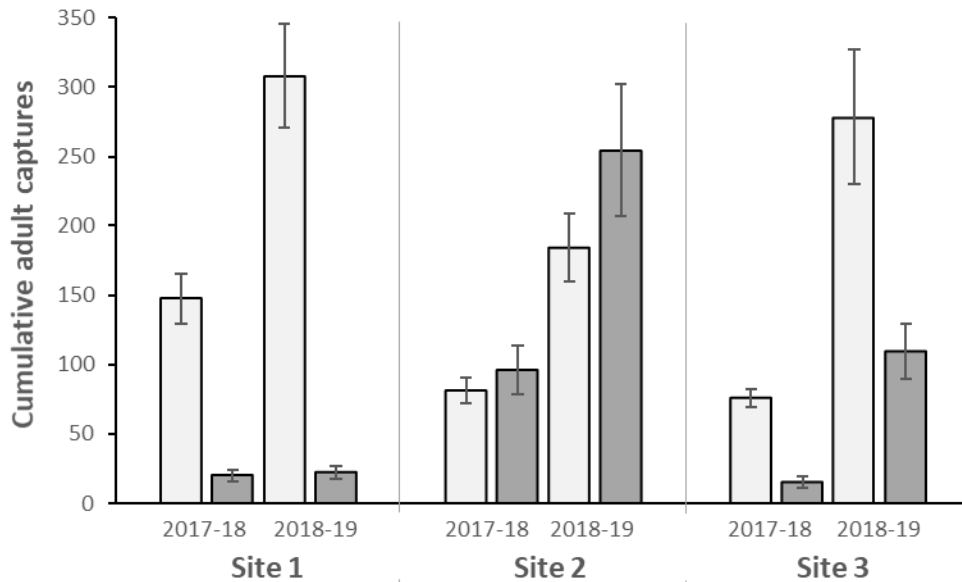


Figure 2. Average cumulative captures of *Argyrotaenia sphaleropa* (light grey) and *Bonagota salubricola* (dark grey) adult males in the control plots of the three study sites. Data represent the average of 12 traps. Error bars represent SEM. See text and Table S2 for site descriptions.

Table 2. Average cumulative captures for *Argyrotaenia sphaleropa* and *Bonagota salubricola* per treatment and season. Averages are calculated from cumulative captures of all traps and sites. Different letters indicate significant differences between seasons or treatments for each species ($p < 0.05$).

Season	Treatment	<i>A. sphaleropa</i>	<i>B. salubricola</i>
2017/18	Control	86.07 ± 7.70 b	28.11 ± 5.29 B
	Mating disruption	0.98 ± 0.82 c	0.94 ± 0.87 C
2018/19	Control	215.51 ± 12.30 a	84.80 ± 10.90 A
	Mating disruption	0.98 ± 0.82 c	0.23 ± 0.43 C

3.2 Fruit damage

For both seasons, monthly fruit assessments showed that leafroller damage was similar in mating disruption and chemical control plots (Figure 3). The apple variety in all sampling areas (Red) is usually harvested in early-March, but in the 2017-18 season it was harvested in late February, so no damage data was available from March. Fruit monitoring in the first season showed overall low damage levels. In the second season, the higher population levels resulted in overall higher damages specially in February, coinciding with the adult peak observed early that month (Fig. 1). Noteworthy, the leafroller population peak appears to have been suppressed in the nearby MD-treated plot within the same orchard. Finally, in the second season the fruit sampling closer to harvest (March) showed lower damage than earlier in the season (Figure 3).

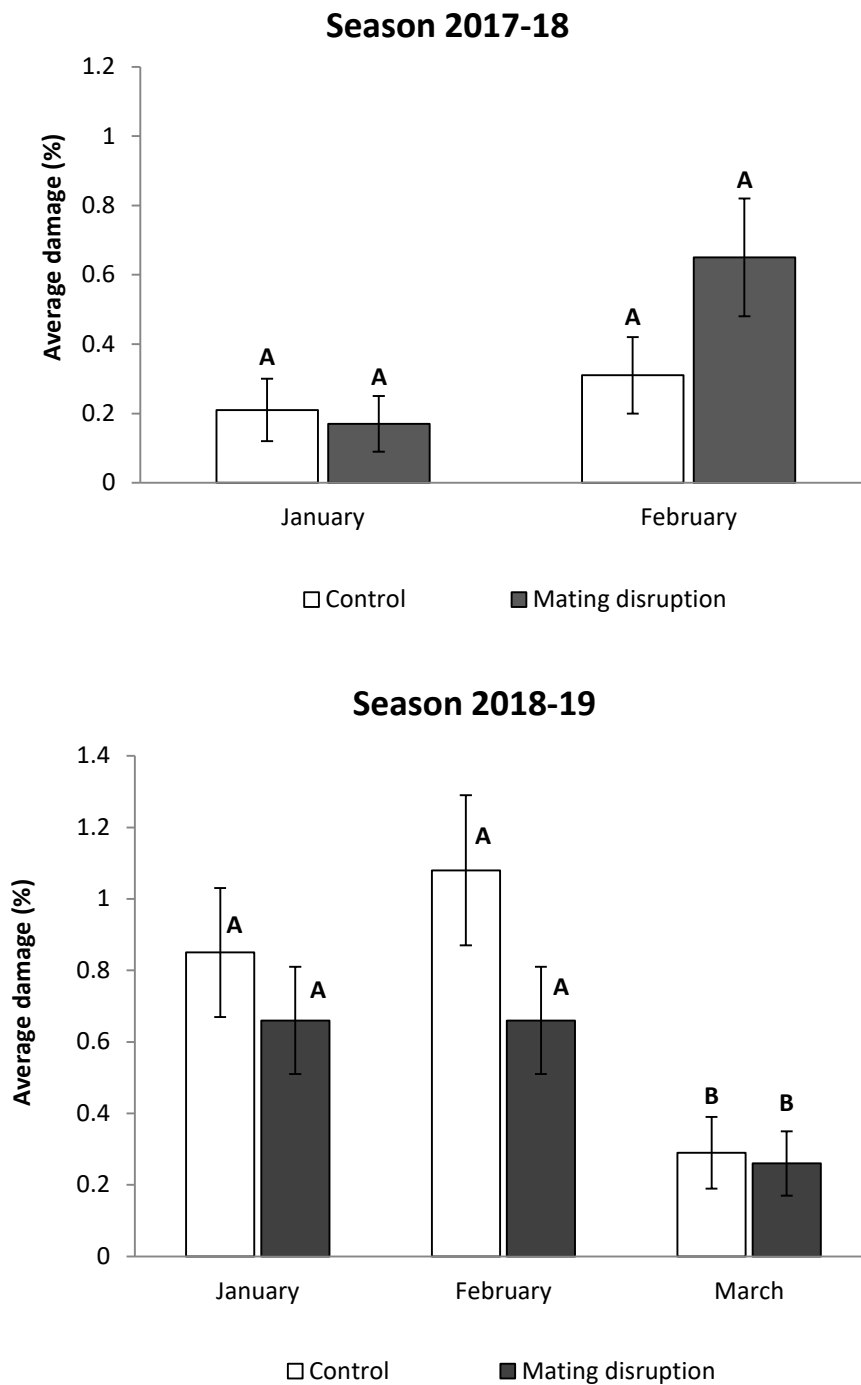


Figure 3. Monthly percent average fruit damage from samples of 800 fruits in plots with mating disruption (dark grey bars) and control treatment (white bars) for different sampling dates and seasons. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.3 Cage experiments

Cage mating rates provided another assessment of MD effectiveness. The tests were done in February, more than three months after the installation of dispensers. Females from cages placed in the mating disruption plot were significantly less successful in laying viable eggs in the case of *A. sphaleropa* (Table 3; $P < 0.0001$). While most females from the control plots laid viable eggs, and therefore mated with the single male available in the cage, only about a third of the females exposed in MD plots were confirmed to have mated (Table 3). In the case of *B. salubricola* the availability of virgin males and females was not enough to achieve a meaningful sample size, so although the results are in line with those of *A. sphaleropa*, no conclusions can be drawn.

Table 3. Females laying viable eggs after field cage experiments.

	Treatment Plot	N	Females with viable eggs [N (%)]
<i>Argyrotaenia sphaleropa</i>	Control	22	20 (91%)
	MD	22	7 (32%)
<i>Bonagota salubricola</i>	Control	5	4 (80%)
	MD	5	2 (40%)

3.4 Pheromone release rates

Dispenser durability was assessed by weight loss and measured for nearly four months from mid-November (time of dispenser installation) through mid-March (beyond harvest date for most apple varieties). The results show that both dispensers last for the entire season with fairly stable pheromone emission levels up to 90 days, then decreasing towards the month of the measurement period (Figure 4).

The dispenser weight loss was well represented by the quadratic function, resulting in significant models with coefficients of determination above 0.99

for both dispenser types and seasons (Table 4). The numbers of days in the field to reach the minimum dispenser weight (pheromone depletion) was estimated for each model (Table 4). Even though the estimated days when the minimum weight is reached is outside the model definition zone, they do confirm that the dispensers have a duration of at least 119 days, covering the entire productive season.

Table 4. Quadratic regression parameters [β_2 , β_1 and β_0] and coefficient of determination (R^2) for dispenser weight versus time (x , days), per species and season. Depletion time (Days) was estimated from the first derivative [$-\beta_1/2\beta_2 = 0$].

Species	Season	β_0	β_1	$\beta_2 \times 10^{-6}$	R^2	Days
<i>Argyrotaenia sphaleropa</i>	2017-18	0.95	- 0.001	3.6	0.9966	139
	2018-19	0.94	- 0.001	4.2	0.9947	119
<i>Bonagota salubricola</i>	2017-18	0.95	- 0.00089	2.5	0.9924	178
	2018-19	0.94	- 0.0007	1.8	0.9955	194

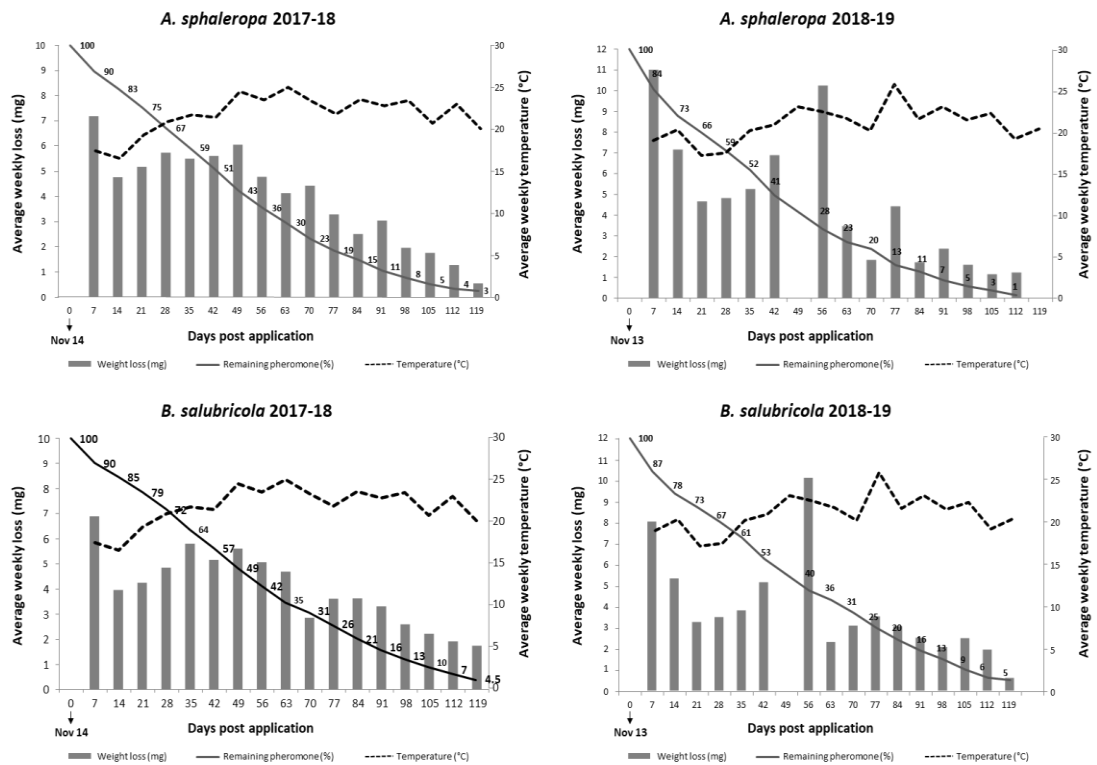


Figure 4. Seasonal weight loss of MD dispensers of *Argyrotaenia sphaeropa* (top charts) and *Bonagota salubricola* (bottom charts) for two consecutive seasons (N = 12 dispensers / species / season). Bars represent average weekly emission rates (mg). Numbers above remaining pheromone trends represent the percent pheromone remaining. Weekly temperature variations are shown for reference. Values in week 49 of 2018/19 are missing due to wet dispensers that resulted in invalid weight measurements.

4 DISCUSSION

Our results show that mating disruption (MD) is feasible and effective as a control strategy for the leafrollers *A. sphaeropa* and *B. salubricola* in apple orchards. The assessment of fruit damage, the main indicator for MD efficacy, showed that MD-treated plots and conventional insecticide-managed plots did not differ in the presence of fruit with leafroller damage, which varied between 0% and 1.8% for MD and between 0% and 2.8% in

plots under conventional control. These results coincide with the data presented by Pastori et al., in relation to the percentage of fruit damage by *B. salubricola*, comparing plots with MD and integrated pest control, which even in the presence of MD reported higher damage percentages, up to 4.75%.²⁶ Unfortunately, due to the commercial nature of the orchards that were available for the experiments, we were not able to compare MD-treated with untreated control plots. The comparison therefore is between MD and insecticide control, with fruit damage within acceptable ranges under both management strategies. As shown in Table S2, an important usage of insecticides targeting leafrollers was avoided in the MD-treated plots.

The experiments were conducted throughout two consecutive seasons in three plots located in different orchard estates. As shown in Table 1, prior to the deployment of MD dispensers, the estates differed in the relative and absolute abundance of both species, mostly due to different levels of the more abundant *A. sphaeropa*. This initial difference among plots did not affect the damage rates, suggesting that MD would be effective under various initial populations. The initial population levels were also compared between MD-treated and control plots within each site. One MD and one control plots separated by 200 m were setup in each estate, so as it was expected, levels of trap captures prior to the instalment of MD were similar in the MD-treated and control plots in the first season. However, significant differences were found in trap captures between MD-treatment and control plots in the second season, with some control plots showing higher initial captures. Studies conducted by Porcel et al. report the same result in the tortricids *Spilonota ocellana* and *Hedya nubiferana*, observing a significant increase in the silencing of the traps between the first and second year of the study.³⁴ Our hypothesis to explain this is a carryover effect of the pheromone dispensers from one season to the next since dispensers were not removed after the first experimental season.

After the instalment of MD dispensers, there was a strong and sustained silencing of pheromone traps for both species, in all three plots and in both

seasons. These results agree with those obtained by Pastori et al. in apple orchards, using MD for *B. salubricola*.²⁶ The same phenomenon was reported for the control of other lepidopterans such as *G. molesta*³⁵, *C. pomonella*, *S. ocellana*³⁴, *Cossus insularis*³⁰, *Thaumetopoea pityocampa*³⁶, among others. This contrasted with captures in pheromone traps in all control plots, which were observed throughout the season and clearly showed the usual population fluctuation patterns. Captures in the control plots also showed that the initial population differences between species, seasons and estates were maintained later in the season, as shown by cumulative captures. However, these differences did not affect trap silencing in the MD-treated plots, again suggesting that population levels and relative proportion of the leafrollers does not seem to be a problem for the effectiveness of MD. Trap silencing is a good indicator of effective control by mating disruption, so this clear-cut effect provides strong support for MD for both leafrollers, however, it has been proven that mating can occur even with total inhibition of captures in traps, for which other indicators must be estimated.³⁴

Fruit damage assessment showed low and stable damage rates throughout both seasons. One of the plots, labelled as 2, showed an increase in fruit damage in January and February of the second season in the control plot, which seems to have been suppressed by MD. In contrast, the same site showed higher damage in the MD-treated plot by the end of the first season, showing some inconsistent results in this particular site, which was coincidentally the site with higher proportion of *B. salubricola* with respect to *A. sphaeropa*. The size and shape of the orchards are key in reducing damage when the MD technique is applied. The immigration of fertilized females from outside the treated area may be a factor that explains the results obtained in plot 2, since the efficacy of the MD technique in a specific orchard compared to the application on a wide area, may not reach its optimal level.^{2,34} Worth of note, damage by both leafrollers cannot be differentiated by monitoring the fruit. Overall, fruit damage was low and not different between MD-treated and

conventional insecticide leafroller management, further supporting MD as an effective technique for these species.

Caged adult couples provided another line of support for MD. One female and one male, both unmated, were enclosed overnight to allow mating. The close proximity of male and female in the cage would favour mating even under conditions that prevent the male to follow a pheromone plume. However, the rate of mating, estimated as the females laying viable eggs, showed that under MD conditions mating is greatly suppressed, at least for *A. spheropa*. About 9 of 10 females exposed to males in the control plot laid viable eggs, while only 3 out of 10 did so when left in the MD-treated plot. Mating evaluation studies carried out for *Lobesia botrana*²⁹, *C. pomonella*³⁴ and *C. insularis*³⁰, coincide in that the proportion of fertilized females is higher in the control plots in relation to MD-treated plots.

These results would indicate that after approximately four months after installing the pheromone dispensers, at least for *A. spheropa*, they still release an adequate amount of it under field conditions; sufficient even to prevent mating with male and female in close proximity. This also reaffirms that the installation date of the pheromone dispensers (early November) was correct, in accordance with what was evaluated by Pastori et al., where later installation dates (December) decreased the mating interruption rate by almost 20%.²⁶

In the case of *B. salubricola* there was a similar trend, but the low number of replicates achieved prevents to draw any conclusions.

Finally, dispenser weight loss was followed through the season under field conditions, resulting in relatively stable weight loss for more than 100 days for both dispenser types, also consistently across seasons. This indicates that the rope dispensers with the pheromone formulation for *A. spheropa* and *B. salubricola* last for the entire growing season, with no re-application needed. From an economic feasibility standpoint this is also an encouraging result.

Overall, our results strongly support the MD technique for the combined management of the native leafrollers *A. sphaleropa* and *B. salubricola* in apple orchards under area-wide MD management for codling moth and oriental fruit moth. Further evaluation of the technique would possibly require a large-scale experiment and an economical assessment of the costs for the growers.

5 CONCLUSIONS

The efficacy of the mating disruption method for *A. sphaleropa* and *B. salubricola* was demonstrated by registering a complete trap silencing, the decrease in the mating rate of adults of *A. sphaleropa* and an adequate duration of the pheromone dispensers in field, with no need to replace them. Despite the fact that damage percentages exceeding 1% were sometimes recorded, since no significant differences were found between the treatments, we can affirm that the mating disruption technique obtained similar results to the chemical control method. However, the big difference is that in the face of similar levels of fruit discard caused by these pests, the use of mating disruption has broad advantages over the environment and the human health, by reducing the number of insecticide sprays.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank to Shin-Etsu Chemical Company and especially to Naoki Ishibashi, Takeshi Kinsho, Tatuya Fujii y Toshi Nojima. Also thank the Fund for the Promotion of Agricultural Technology (FPTA) of the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) from Uruguay, for financing this study, the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) for the scholarship granted, and the fruit growers for allowing us to carry out this research in their orchards.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

CONTRIBUTION STATEMENT

VM, AG IS and VH conceived and designed research. VM, AG, IS and VH conducted experiments. VM, IS and AB analyzed data; VM, AG and IS wrote the first version of the manuscript. All authors read, commented, and approved the manuscript.

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information may be found in the online version of this article.

REFERENCES

1. Miller JR and Gut LJ, Mating disruption for the 21st century: matching technology with mechanism. *Environ Entomol* **44**:427-443 (2015).
2. Cardé RT and Minks AK, Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. *Annu. Rev. Entomol.* **40**: 559-585 (1995).
3. Gut JL and Brunner JF, Pheromone based management of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Washington apple orchards. *J Agric Urban Entomol.* **15**(4): 387-406 (1998).
4. Knight A, Codling moth areawide integrated pest management. In Koul, O., G. Cuperus and N. Elliot (eds). 2008. Areawide pest management. *CAB International*, p 159-190 (2008).
5. Scatoni I, Núñez S and Bentancourt C, Las feromonas sexuales: una estrategia para el control de plagas respetuosa del medio ambiente. *Insectos y Medio Ambiente*, DINAMA. Montevideo. 11-28 (2002).
6. Thomson D, Brunner J, Gut L, Judd G and Knight A, Ten years implementing codling moth mating disruption in the orchards of Washington and British Columbia: starting right and managing for success. *IOBC/WPRS Bull.* **24**:23–30 (2001).
7. Witzgall P, Stelinski L, Gut L and Thomson D, Codling moth management and chemical ecology. *Annu Rev Entomol* **53**:503-522 (2008).
8. Stelinski LL, McGhee P, Grieshop M, Brunner J and Gut. LJ, Efficacy and mode of action of female equivalent dispensers of pheromone for mating disruption of codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Agric Forest Entomol* **10**:389–397 (2008).
9. McGhee PS, Epstein DL and Gut LJ, Quantifying the benefits of mating disruption programs targeting codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Amer Entomol.* **57**:94–100 (2011).
10. Walker KR, Welter SC, Potential for outbreaks of leafrollers (Lepidoptera: Tortricidae) in California apple orchards using mating disruption for Codling Moth suppression, *J Econ Entomol.* **94**(2):373–380 (2001).

11. Knight A, The impact of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) mating disruption on apple pest management in Yakima Valley, Washington. *J Entomol Soc BC*. **92**: 29-38 (1995).
12. Brunner J, Welter S, Calkins C, Hilton R, Beers E, Dunley J, Unruh T, Knight A, Van Steenwyk R, Van Buskirk, P, Mating disruption of codling moth: a perspective from the Western United States. *IOBC wprs Bulletin*, **25**(9): 11-20 (2002).
13. Bentancourt CM and Scatoni I, Lepidópteros de importancia económica. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. Hemisferio Sur. Facultad de Agronomía (Udelar), Uruguay. 437 p (2006).
14. Bentancourt CM, Scatoni IB, González A and Franco J, Effects of larval diet on the development and reproduction of *Argyrotaenia spheropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae). *Neotrop. Entomol.* **32**: 551-557 (2003).
15. Bentancourt CM, Scatoni IB, González A and Franco J, Biology of *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) on seven natural foods. *Neotrop. Entomol.* **33**: 299-306 (2004).
16. Núñez S, Duarte F, Scatoni I, Croce C and Carbone F, Hacia un manejo regional de plagas en frutales. *Revista INIA Uruguay* **26**:61-64 (2011).
17. Núñez S and Scatoni I, Current pest management status in IFP in Uruguay. Proceeding of the 5th International Conference on Integrated Fruit Production. Lleida, October 22-26, 2000. *Bulletin OILB/SROP* **24**(5): 259-263 (2001).
18. Núñez S and Scatoni I, Tecnología disponible para el manejo de plagas en frutales de hoja caduca. Montevideo, INIA 150p (2013). ISSN/ISBN: 16889266 (disponible en www.inia.org.uy). [accessed 14 May 2019]
19. Zoppolo R, Scatoni I, Duarte F, Mujica MV and Gabard Z, Area-wide pest management in deciduous fruits of southern Uruguay. *Acta Horti* **1137**:153 –160 (2016).
20. Unelius CR, Eiras A, Witzgall P, Marie Bengtsson M, Kpvaleski A, Viliela EF, Borg Karlson AK, Identification and synthesis of the sex pheromone

- of *Phtheochroa cranaodes* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae). *Tetrahedron Lett* **37**(9):1505-1508 (1996).
21. Eiras AE, Kovaleski A, Vilele EF, Chambon JP, Unelius CR, Borg-Karlson AK, Liblikas I, Mozuraitis R, Bengtsson M and Witzgall P, Sex pheromone of the Brazilian apple leafroller, *Bonagota cranaodes* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae). *Z Naturforsch C J Biosci*. **54**(7-8):595-601 (1999).
 22. Núñez S, de Vlieger JJ, Rodriguez CJ, Persoons J and Scatoni IB, Sex pheromone of South American tortricid moth *Argyrotaenia spheropa*. *J Chem Ecol* **28**(2):425-432 (2002).
 23. Legrand S, Botton M, Coracini M, Witzgall P and Unelius CR, Synthesis and field tests of sex pheromone components of the leafroller *Argyrotaenia spheropa*. *Z Naturforsch C J Biosci* **59**:708-712. (2004).
 24. Bavaresco A, Núñez S, García M, Botton M and Sant'Ana J, Atração de machos da lagartada-fruteiras *Argyrotaenia spheropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) aos componentes do feromônio sexual sintético na cultura do caqui. *Neotrop. Entomol.* **34**(4):619-625 (2005).
 25. Morandi Filho WJ, Botton M, Grützmacher AD and Núñez S, Flutuação populacional de *Argyrotaenia spheropa* (Meyrick, 1909) (Lep: Tortricidae) com emprego de feromônio sexual sintético na cultura da videira. *Rev Bras Frutic* **29**:213-216 (2007).
 26. Pastori PL, Arioli CJ, Botton M, Bittencourt Monteiro L, Stoltman L and Mafra-Neto L, Integrated control of two tortricid (Lepidoptera) pests in apple orchards with sex pheromones and insecticides. *Rev Colomb Entomol* **38**(2):224-230 (2012).
 27. Martínez N and Núñez S, Evaluación de atraccidas para el control de lagartitas de los frutales (*Argyrotaenia spheropa* y *Bonagota cranaodes*). In: XI Congreso Nacional de la Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura (SUHF), Montevideo. (2007). Disponible en: [accessed 29 april 2020]

28. Heguaburu V, Rasquin K, Martínez V, González A and Scatoni IB, Producción y evaluación de feromonas sexuales para el control de tortricidos nativos (Lepidoptera: Tortricidae) en frutales de pepita. Serie INIA-FPTA, Uruguay, 42 p (2019).
29. Briand F, Guerin PM, Charmillot PJ and Kehrlí P, Small cages with insect couples provide a simple method for a preliminary assessment of mating disruption. *Sci. World J.* Volume 2012, 8p (2012).
30. Hoshi H, Takabe M and Nakamuta K, Mating disruption of a carpenter moth, *Cossus insularis* (Lepidoptera: Cossidae) in apple orchards with synthetic sex pheromone, and registration of the pheromone as an agrochemical. *J Chem Ecol* **42**(7):606-611 (2016).
31. Shorey HH, Hale RL, Mass rearing of the larvae of nine noctuid moth species on a simple artificial medium. *J Econ Entomol* **58**(3): 522–524. (1965).
32. Di Rienzo JA, Guzman AW and Casanoves F, A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* **7**(2), 129–142 (2002).
33. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2017. Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. Centro de Transferencia InfoStat, FCA. [En línea]: URL <http://www.infostat.com.ar>. (2017). [accessed 11 July 2017]
34. Porcel M, Sjöberg P, Swiergiel W, Dinwiddie R, Rämert B, Tasin M, Mating disruption of *Spilonota ocellana* and other apple orchard tortricids using a multispecies reservoir dispenser. *Pest Manag. Sci.* **71**(4): 562-570 (2015).
35. De Lame FM, Gut LJ, Effect of monitoring trap and mating disruption dispenser application heights on captures of male *Grapholita molesta* (Busck; Lepidoptera: Tortricidae) in pheromone and virgin female-baited traps. *Environ Entomol.* **35**(4):1058-1068 (2006).
36. Trematerra P, Colacci M, Athanassiou CG, Kavallieratos NG, Rumbos CI, Boukouvala MC, Nikolaidou AJ, Kontodimas DC, Benavent-Fernández E,

Gálvez-Settier S, Evaluation of mating disruption for the control of *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) in suburban recreational areas in Italy and Greece. *J Econ Entomol.* **112**(5): 2229-2235 (2019).

Supplementary material

Table S1. Main characteristics of the three experimental orchards and treatment plots.

Site	1	2	3
Coordinates	S 34° 48' 2.65"	S 34° 44' 10.05"	S 34° 43' 54.97"
	W 56° 17' 3.28"	W 56° 17' 57.07"	W 56° 19' 39.77"
Total size (Ha) ¹	16	9.2	46
Main crops ²	Apple/Peach	Apple/Pear/Peach	Apple/Pear
Treatment	Apple variety (Ha)		
Mating disruption	Gala (0.9) Red delicious-Gala (1.7) [*] Red scarlet (0.7)	Red delicious (1.9) Galaxy-Red delicious (0.5) [*] Red chief (0.6)	Early red one (3.6)
Total area (Ha)	3.3	3.1	3.6
Control	Gala (1.6) Red delicious-Gala (1.2) [*] Red chief (0.8)	Early red one (1.8) Red chief (1.3) Red delicious (0.6)	Early red one (4.1)
Total area (Ha)	3.6	3.7	4.1

¹ indicates total area of the estate

² indicates other fruit crops in the area besides apple orchards

^{3*} mixed orchards with both varieties

Table S2. Insecticide sprays, with direct or collateral control on leafrollers, in control plots for the three sites during the 2017-18 season.

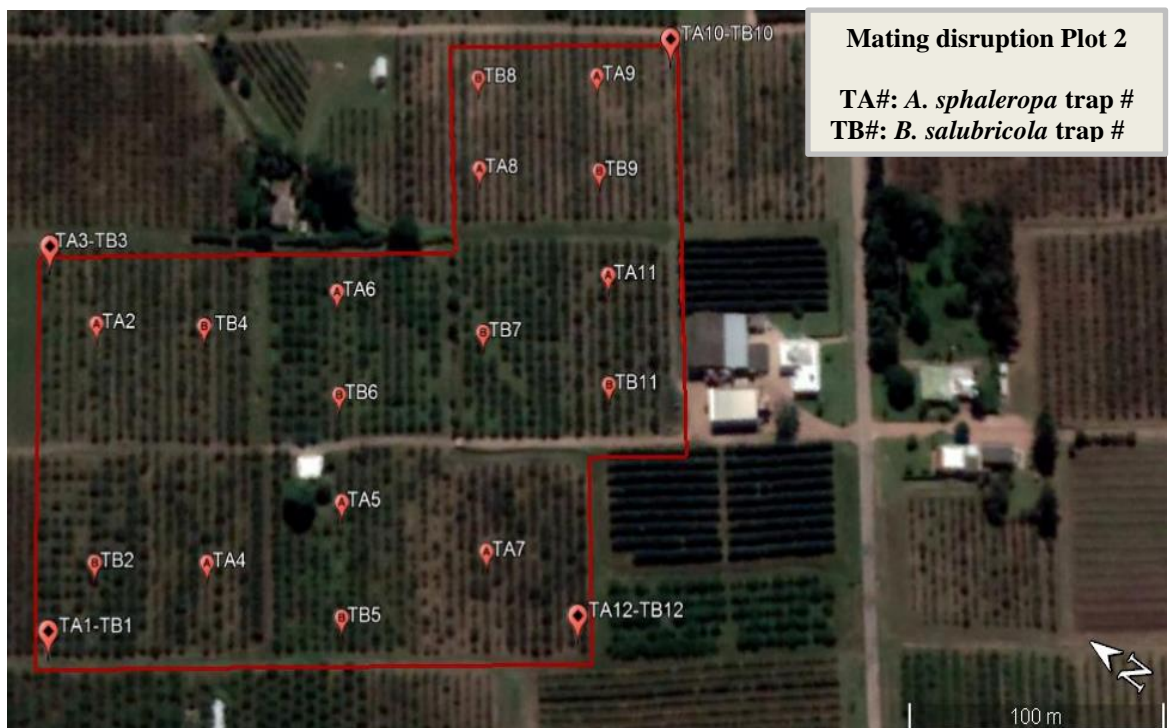
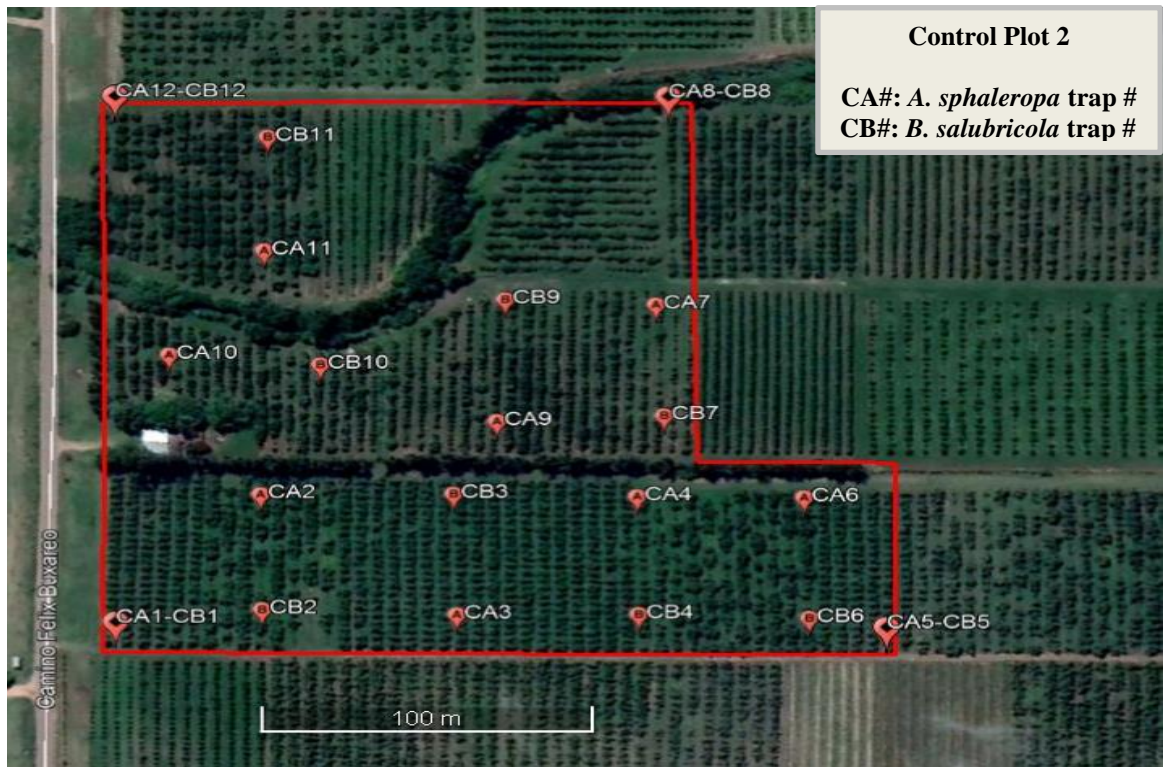
Site	Spray date	Active ingredient	Active ingredient/ha
1	October 14	pyriproxifen	15 cc
	December 13	methoxifenozone	150 cc
2	October 13	novaluron	150 cc
	December 7	methoxifenozone	150 cc
	December 27	cispermethrin	75 cc
	January 18	matrine	75 cc
	February 13	cispermethrin	75 cc
	February 23		
3	December 18	methoxifenozone	150 cc
	January 26	deltamethrin	15 cc
	January 30	malathion	3000 cc
	February 10	phosmet	1500 gr
	February 20	malathion	3000 cc

Table S3. Insecticide sprays with direct or collateral control on leafrollers, in control plots for the three sites during the 2018-19 season.

Site	Spray date	Active ingredient	Active ingredient/ha
1	October 10	methoxifenozone	150 cc
	October 19	methoxifenozone	150 cc
	January 4	deltamethrin	15 cc
	January 31	deltamethrin	15 cc
	March 2	deltamethrin	15 cc
2	February 21	spinosyn A and D	110 cc
3	December 22	methoxifenozone	150 cc
	January 2		
	January 21		
	February 7		
	February 26		

Figure S1. Aerial photographs of the three experimental sites and treatment distribution.





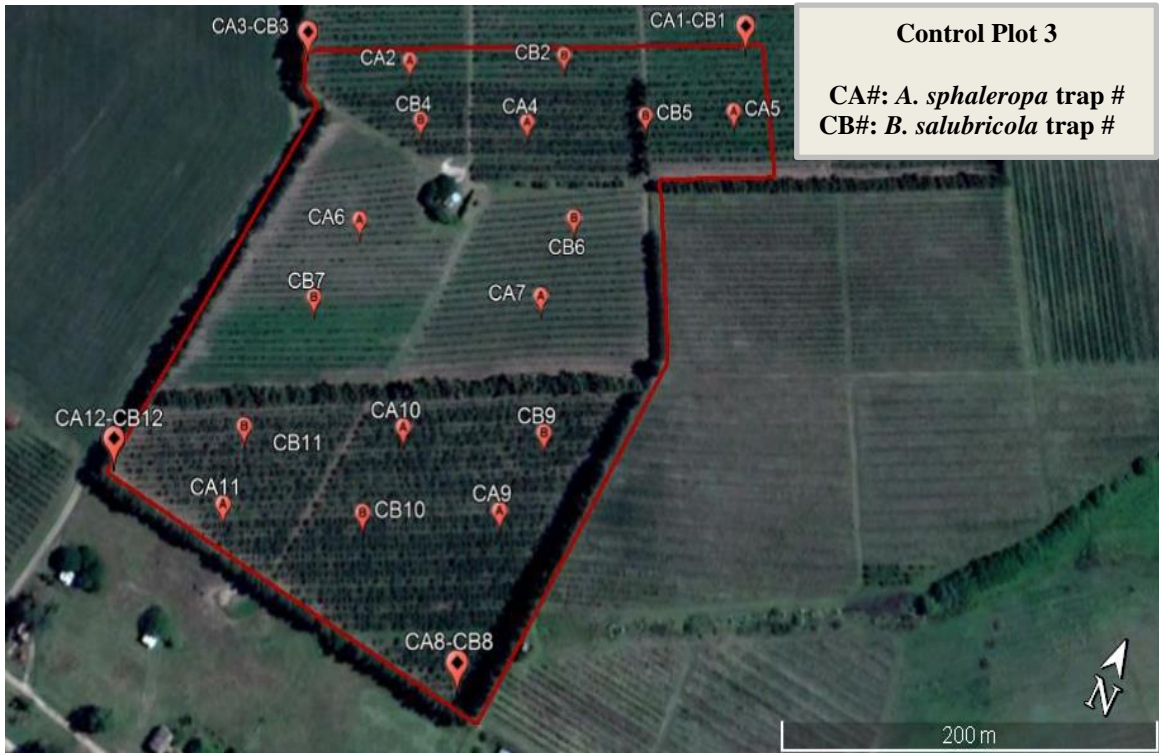


Figure S2. Quadratic model fit for the average dispensers weight data (blue points) and the prediction intervals (black outer lines) for each species in each year ($P < 0.0001$).

