



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales - Programa de Doctorado en Ciencias Forestales

**OPCIONES PARA EL MANEJO INTEGRADO DE *SIREX NOCTILIO*
(FABRICIUS) (HYMENOPTERA: SIRICIDAE) EN PLANTACIONES DE
PINUS RADIATA (D. DON) EN CHILE**



Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Forestales

MIGUEL ANGEL POISSON SOTO

Profesor Guía: Dr. Andrés Angulo Ormeño
Departamento de Silvicultura - Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

Mayo 2019
CONCEPCIÓN-CHILE

OPCIONES PARA EL MANEJO INTEGRADO DE *Sirex noctilio* (FABRICIUS) (HYMENOPTERA: SIRICIDAE) EN PLANTACIONES DE *Pinus radiata* (D. DON) EN CHILE

Comisión Evaluadora:

Andrés Angulo O. (Profesor guía)
Biólogo, Dr.

Eugenio Sanfuentes V. (Profesor co-guía)
Ingeniero Forestal, Dr.



Fernando Muñoz S. (Comisión evaluación)
Ingeniero Forestal, Dr.

René I Alfaro (Comisión evaluación)
Ingeniero Forestal, PhD.

Directora de Postgrado:

Darcy Ríos L.
Prof. Biología y Química, Dra.

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Jorge Cancino C.
Ingeniero Forestal, PhD.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa y mis hijos por su apoyo incondicional y por todo el tiempo que les falté, para lograr la finalización de este trabajo

A mis padres (QEPD), que son mi ejemplo y guía en esta vida

A mis amigos y compañeros de trabajo, que me apoyaron irrestrictamente, especialmente Sandra Fuenzalida, Leonardo Fernández, Rodrigo Saavedra, Juan José Quiroga, Cristián Montes, Alessandro Rotella, Rodrigo Burgos, Cristián Barría, Hernán Martínez, Hebert Ojeda y Simón Sandoval entre muchos más

A Bioforest y especialmente a su gerente Sr. Eduardo Rodríguez, por el apoyo y facilidades para llevar a cabo este proyecto

A Rodrigo Ahumada, jefe División de Bioforest por sus consejos y amistad, junto con el apoyo técnico y comprensión para finalizar esta Tesis

A mis profesores, por sus consejos y apoyo en las distintas etapas de este trabajo

A la Universidad de Concepción y su programa de Doctorado en Cs. Forestales, por darme la oportunidad de acceder a conocimientos y experiencias de primer nivel

Y a todos aquellos que piensan que existen proyectos imposibles.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN	xii
SUMMARY.....	xv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
<i>Sirex noctilio</i> : Aspectos generales de su biología, ecología y manejo	1
Opciones para la detección y control de <i>S. noctilio</i>	4
Cuantificación de poblaciones de Sirex dentro de los árboles	6
Deladenus siricidicola como biocontrolador de <i>S. noctilio</i>	8
Resumen nuevas opciones de manejo a evaluar	10
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	12
Objetivos específicos	12
2. MEGA-TRAP-PLOTS: A NOVEL METHOD OF SIREX WOODWASP MANAGEMENT ON PINUS RADIATA PLANTATIONS IN CHILE.....	13
ABSTRACT	13
1.- INTRODUCTION.....	14
2.- MATERIALS AND METHODS	16
2.1.- Area of study and establishment of Mega-Trap-Plots (MTPs)	16
2.2.- Emergence period of <i>Sirex noctilio</i>	18
2.3.- The attack level in the Mega-Trap-Plots	20
2.4.- The infestation level in the Mega-Trap-Plots.....	20
2.5.- Estimation of larval and adult populations of <i>S. noctilio</i> in the Mega-Trap-Plots.....	21

2.6.- Experimental design and statistical analysis	21
3.- RESULTS.....	23
3.1.- Emergence period of <i>Sirex noctilio</i>	23
3.2.- The attack level in the Mega-Trap-Plots	23
3.3.- The infestation level in the Mega-Trap-Plots.....	26
3.4.- Estimation of the larval and adult population of <i>S. noctilio</i> in the Mega-Trap-Plots ...	26
4.- DISCUSSION	28
5.- CONCLUSIONS	31
6.- ACKNOWLEDGEMENTS.....	32

3. MODELING WITHIN-TREE POPULATION, INFESTATION PROBABILITY AND MOISTURE CONTENT FOR SIREX NOCTILIO AFFECTING PINUS RADIATA IN CHILE.....

ABSTRACT	33
1. INTRODUCTION	33
2. MATERIALS AND METHODS.....	36
2.1.- Study sites	36
2.2.- Sample Trees	37
2.3.- Data Analysis	39
2.4.- Modeled within-tree population based on bolt subsamples taken at different heights.	39
2.5.- Within-Tree infestation pattern as related to tree height and bark thickness.	40
2.6.- Wood moisture vertical distribution on infested and healthy trees.	41
3. RESULTS.....	41
3.1.- Modeled within-tree population based on bolts subsamples taken at different heights...	41
3.2.- Within-Tree infestation pattern as related to tree height and bark thickness.	47
3.3.- Wood moisture vertical distribution on infested and healthy trees	50
4. DISCUSSION.....	52
5. ACKNOWLEDGEMENTS	54

4. INOCULACIONES INUNDATIVAS DE DELADENUS SIRICIDICOLA COMO METODO PARA AUMENTAR EL PARASITISMO DE SIREX NOCTILIO EN CHILE.....	55
RESUMEN	55
1.- INTRODUCCION.....	56
2.- METODOLOGIA	58
2.1.- Sitios de estudio	58
2.2.- Selección árboles del ensayo.....	59
2.3.- Preparación de dosis de nematodos en laboratorio y envío a terreno	61
2.4.- Ensayos experimentales	62
2.4.1.- Experimento I: Inoculación inundativa de nematodos utilizando diferentes concentraciones de dosis	62
2.4.2.- Experimento II: Inoculación inundativa variando el espaciamiento de las inoculaciones	65
2.5.- Evaluación de trozas inoculadas e instalación de cámaras de crianza	66
2.6.- Análisis de datos.....	67
3.- RESULTADOS.....	67
3.1.- Experimento I: Inoculación inundativa de nematodos utilizando diferentes concentraciones de dosis	67
3.2.- Experimento II: Inoculación inundativa variando el espaciamiento de las inoculaciones	70
4.- DISCUSION.....	71
5.- AGRADECIMIENTOS	75
5. CONCLUSIÓN GENERAL	76
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	79

ÍNDICE DE TABLAS.

2. MEGA-TRAP-PLOTS: A NOVEL METHOD OF SIREX WOODWASP MANAGEMENT ON PINUS RADIATA PLANTATIONS IN CHILE

Table 1: Climatic conditions, soil and site characteristics of the plantations where the trials were located..... 17

Table 2: Total number of trees attacked by *Sirex noctilio* in the Mega-Trap-Plots during the whole period of evaluation for each treatment. Mean \pm SE attack level (%) of *S. noctilio* considering all the trees in the Mega-Trap-Plots and trees effectively weakened by herbicide. The statistical analysis shown for each period of evaluation. 25

Table 3: Number of symptomatic trees analyzed and Mean of infestation by *Sirex noctilio* in the Mega-Trap-Plots, to the end of the evaluation period (July 2011)..... 26

Table 4: Mean \pm SE *Sirex noctilio* larval population per tree and per hectare for each treatment. Estimation of the potential population of *S. noctilio* females (Mean \pm SE), according to attack level, infestation and larvae population. 27

3. MODELING WITHIN-TREE POPULATION, INFESTATION PROBABILITY AND MOISTURE CONTENT FOR SIREX NOCTILIO AFFECTING PINUS RADIATA IN CHILE

Table 1. Summary statistics for all symptomatic trees sampled in various sites, divided into age classes. 38

Table 2. Subset of bolt combinations selected using stepwise regression analysis to predict within-tree population of *S. noctilio* larvae. 42

Table 3. Predictive equations of within-tree *Sirex noctilio* population levels for the best 1st, 2nd, 3rd, 4th, and 5th sampled logs for: A) the lineal regression model and B) bootstrapping validation.44

Table 4. Regression coefficients for the infestation probability model.49

4. INOCULACIONES INUNDATIVAS DE DELADENUS SIRICIDICOLA COMO METODO PARA ACELERAR EL PARASITISMO DE SIREX NOCTILIO EN CHILE

Tabla 1.- Tratamientos y preparación de dosis en el experimento I, de inoculación inundativa de *D. siricidicola*, aumentando la concentración de nematodos por dosis. Decimales fueron omitidos.64

Tabla 2.- Tratamientos del experimento II de inoculación aumentativa de nematodos, mediante aumentos en la densidad de orificios de inoculación de *D. siricidicola*. Decimales fueron omitidos66

Tabla 3.- Parasitismo promedio de hembras de *Sirex*, obtenidos para los tratamientos del ensayo de inoculación inundativa de *Deladenus siricidicola* a través de dosis incrementales (experimento I), durante el período estival del año 2013 para ambos sitios de estudio.....69

Tabla 4.- Parasitismo promedio de hembras de *Sirex*, para los tratamientos del ensayo de inoculación inundativa de *Deladenus siricidicola* a través del incremento en la densidad de orificios de inoculación (experimento II), durante el período estival del año 2013 para los dos sitios de estudio.71

ÍNDICE DE FIGURAS.

2. MEGA-TRAP-PLOTS: A NOVEL METHOD OF SIREX WOODWASP MANAGEMENT ON PINUS RADIATA PLANTATIONS IN CHILE

Figure 1. Study area located in the Biobío region, Chile. 18

Figure 2. A: Schematic representation of a mega-trap-plot four months after establishment. B: A mega-trap-plot located in a *Pinus radiata* plantation near (290 m distant) a control plot. Aerial view of a mega-trap-plot from February 2011. 19

Figure 3. *Sirex* wasp emerged fortnightly from December 2010 to April 2011 in the study area and cumulative emergence (%). 23

Figure 4. Potential population of *Sirex noctilio* females (adults ha⁻¹) for each of the treatments evaluated. Treatment values with the same letter are not significantly different (Tukey's test $p < 0.05$). Bars represent the standard error (SE). 28

3. MODELING WITHIN-TREE POPULATION, INFESTATION PROBABILITY AND MOISTURE CONTENT FOR SIREX NOCTILIO AFFECTING PINUS RADIATA IN CHILE

Figure 1. Geographic distribution of radiata pine plantations infested by *S. noctilio* near Santa Barbara locality, in the Biobío region in Chile. 37

Figure 2. Models to estimate within-tree *Sirex noctilio* population, using different combinations of 1st, 2nd, 3rd, 4th, and 5th sampled logs. Y_x corresponds to the value of *Sirex* woodwasp population per tree. The independent variable X_i indicates the sum of bolts of 1-meter length, extracted from the base of *ith* relative height class (where $i=10, 20, 30$ and consecutively to 90 percent). 45

Figure 3. Pearson's product-moment correlation between the observed and the estimated *Sirex noctilio* population.....46

Figure 4. Probability of infestation by *S. noctilio* according to logit and probit models for four different bark thickness (1, 5, 10 and 15 mm, respectively) and relative height of infested trees.47

Figure 5. Logit model of probability of infestation by *Sirex noctilio* based on age and tree height of radiata pine trees, for four different bark thicknesses (1, 5, 10 and 15 mm).48

Figure 6. Wood moisture variation respect to relative height, for radiata pine trees healthy and infested by *Sirex noctilio*; gray bands correspond to confidence intervals of the mean.50

Figure 7. Wood moisture and relative height, for different age classes of healthy and *Sirex* infested radiata pine.....51

4. INOCULACIONES INUNDATIVAS DE DELADENUS SIRICIDICOLA COMO METODO PARA ACELERAR EL PARASITISMO DE SIREX NOCTILIO EN CHILE

Figura 1. Información climática (pp y T°) del área de estudio, extraídos de la estación Quilaco (DGA), ubicada al SE de los sitios de estudio (14 y 22 km), para el período enero a diciembre 2012.59

Figura 2. A: Clorosis y necrosis en árbol atacado por *Sirex*. **B y C:** Resinación y oviposturas de *S. noctilio* presentes en el fuste de árbol infestado por *S. noctilio*. **D:** Mancha en la madera (color café) atribuible al hongo *Amylostereum areolatum* alrededor de una ovipostura de *Sirex*.60

Figura 3. A: Inoculación de micelio del hongo *Amylostereum areolatum* en medio de cultivo PDA. **B:** Matracas con trigo inoculado con hongo y nematodo, guardados en oscuridad. **C y D:** Matracas con producción apta de nematodos, caracterizados por coloración ennegrecida del sustrato. **E:** Matracas seleccionados con adición de agua destilada para ser agitados con Shaker

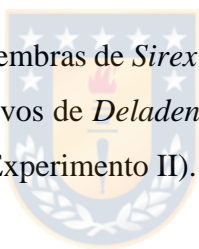
orbital. **F:** Dosis de 20 ml de nematodos ajustada a 1,2 millones de especímenes62

Figura 4. A: Esquema de trozado del árbol infestado N°3 del ensayo, con una sección central de al menos 10 metros con signos y síntomas asociados a *Sirex*. **B:** Cuadro con asignación aleatorizada de los tratamientos para cada uno de los árboles seleccionados.63

Figura 5. A: Esquema de perforaciones efectuadas a las trozas de 2 m de longitud. **B:** Secuencia operaciones: marcar y asignar tratamientos a los árboles, ejecución perforaciones según tratamiento e inoculación de dosis de nematodo.65

Figura 6. Niveles de parasitismo de hembras de *Sirex noctilio* obtenidos en los sitios El Quillay y La Dicha, para los tratamientos del ensayo de inoculaciones inundativas de *Deladenus* modificando la concentración de dosis de inoculación.68

Figura 7. Niveles de parasitismo de hembras de *Sirex noctilio* obtenidos en los sitios El Quillay y La Dicha, con tratamientos inundativos de *Deladenus* (1X, 2X y 4X) basados en variaciones del espaciamiento de inoculaciones (Experimento II).70



RESUMEN

Sirex noctilio, es una de las plagas forestales más importantes que se han introducido sobre *Pinus radiata* en Chile. Ingresó al país el año 2001 y se dispersó en forma fragmentada por las regiones de Los Lagos hasta la Araucanía en un lapso de nueve años, sin causar daño económico probablemente por un bajo nivel de estrés de las plantaciones de *P. radiata* y por un alto nivel de parasitismo alcanzado por el nematodo biocontrolador *Deladenus siricidicola*, que comenzó a liberarse a partir del año 2007. Sin embargo, el ingreso de Sirex a la región del Biobío el año 2009, significó mayores niveles de daño en los rodales afectados, constatándose hasta 50% de árboles atacados en algunos rodales. Este mayor potencial de daño de las plantaciones ubicadas al norte del Biobío, que presentarían mayor estrés hídrico y ausencia de manejo (raleos y podas), sobre todo en zonas de baja productividad, como son los suelos arenosos en la región del Biobío, motivaron a desarrollar esta investigación para evaluar nuevas opciones de manejo de *S. noctilio*.

En plantaciones infestadas por Sirex en la comuna de Santa Bárbara, región del Biobío, se evaluó un nuevo método de control denominado Parcelas-Mega-Trampa (PMT), consistentes en un área de 1 ha con árboles trampa que fueron tratados con herbicida, en cuatro épocas diferentes (noviembre a febrero). El objetivo fue determinar el efecto de las PMT en reducir la población potencial de hembras de *S. noctilio* en diferentes épocas de instalación de las PMT, que maximizan las oviposiciones y posterior colonización de Sirex en los árboles trampa. Los resultados indicaron que PMT instaladas de noviembre a enero presentaron la mayor infestación por Sirex, variando desde 91% hasta 78,1%, coincidiendo con el período de vuelo de Sirex en la zona de estudio. Las PMT instaladas en noviembre concentraron una población potencial de 57.901 hembras por ha, que representan 5,4 veces a la obtenida en parcelas control con 10.701 hembras, demostrando el potencial de las PMT's, para reducir poblaciones de la plaga.

En rodales infestados por Sirex, conocer la población dentro de los árboles infestados permitiría estimar el número potencial de adultos de avispa por hectárea y con ello, priorizar medidas de manejo en los rodales afectados. Para lograr esto, sería necesario disectar todos los árboles infestados lo que requiere enormes recursos logísticos. En esta investigación, el objetivo

fue construir un modelo óptimo que predijera la población de *S. noctilio* dentro de los árboles infestados y caracterizar la probabilidad de infestación en altura junto con el contenido de humedad. Para ello, utilizando una base de 141 árboles de *P. radiata* sintomáticos a Sirex, que fueron disectados completamente en secciones de 1 m de largo, se desarrollaron modelos que estiman la población del insecto dentro de un árbol, utilizando desde dos a cinco trozas extraídas a distintas alturas relativas. El modelo óptimo que balancea costo y fiabilidad estadística, predice la población dentro del árbol utilizando tres trozas de 1 m, extraídas al 30%, 50% y 70% de la altura relativa. Además, se generó una ecuación que estima la probabilidad de infestación de *S. noctilio* a lo largo del tronco, basada en un modelo lineal generalizado con transformación logit, que muestra que la probabilidad de infestación por *S. noctilio* a lo largo del tronco, para todas las edades estudiadas, aumenta a medida que se incrementa la altura total y que disminuye el espesor de corteza. Ambos modelos, son los primeros en ser desarrollados para *S. noctilio* infestando árboles de *P. radiata*. Finalmente, se obtuvo el patrón de variación en altura del contenido de humedad de árboles atacados y sanos, constatándose que la humedad decrece a medida que aumenta la altura de los árboles atacados, siendo el umbral de 40% el valor límite de contenido de humedad para la sobrevivencia de las larvas.

Finalmente, se evaluó el efecto sobre el parasitismo de *D. siricidicola* en plantaciones infestadas recientemente por *S. noctilio* en la región de Biobío, de la cantidad de nematodos inoculados, variando las dosis y espaciamiento en la inoculación. Para ello, se instaló dos ensayos en sitios ubicados en Quilaco, región del Biobío, donde se inoculó *Deladenus siricidicola* con dos métodos; aumentando la concentración mediante variaciones en el número de nematodos inoculados por orificio, o aumentando la densidad de perforaciones por árbol, inoculando la misma cantidad de nematodos por orificio. Con el primer método, utilizando una dosis seis veces mayor que el estándar (6X), se registró un parasitismo promedio de 84,6%, significativamente mayor al método de árboles no inoculados (29,5%) y al del tratamiento con mitad de dosis (55,5%). Con el otro método, de variar la densidad de inoculaciones, al incrementar cuatro veces la dosis (4X) se obtuvo en uno de los sitios (La Dicha) un parasitismo de 74,3%, que fue 26,7 puntos porcentuales mayor que el tratamiento estándar de 1 dosis (1X) y 40 puntos porcentuales mayor que el de árboles no inoculados. Sin embargo, la respuesta no

fue consistente en el otro sitio (El Quillay), obteniéndose parasitismos similares para las dosis de 1X, 2X o 4X, que en promedio alcanzaron un 79,2%, superior en 54,7 puntos porcentuales al control. Con estos resultados, se concluye inocular una dosis aumentada seis veces (6X), que equivale a 1,45 millones de nematodo por árbol. El otro método de densificar inoculaciones, se descartaría por mayores costos y logística.



SUMMARY

Sirex noctilio is one of the most important forest pests that have been introduced on *P. radiata* in Chile. It was first detected in the year 2001 and its geographic dispersal was non-continuous, found throughout various regions such as Los Lagos and Araucanía. For nine years, there was no economic damage observed, probably due to less susceptibility and stress of the *P. radiata* plantations and high parasitism rates obtained with the nematode *Deladenus siricidicola*, released since 2007. However, *Sirex* detection on the Biobío Region, during the year 2009 caused significant damage to infested stands, affecting up to 50% of the trees. Highest damage potential to *Sirex* was found on the northern Biobío region due to two major reasons: (1) lack of water and (2) lack of thinning. These reasons motivated this research for novel *Sirex* management options. On *radiata* pine plantations infested by *Sirex* in the locality of Santa Bárbara, Biobío region, a novel control method named Mega-Trap-Plots (MTP) was evaluated. It consisted of an area of 1 ha with trap trees that were treated with herbicide, in four different months (November to February). The goal was to determine the effect of MTP in reducing the potential population of *S. noctilio* females at different months of installation of the MTP, throughout the maximization of oviposition's and subsequently development of *Sirex* adults in the trap trees. The results indicated that MTP installed from November to January had the highest infestation by *Sirex*, varying from 91% to 78,1%. These periods coincided with the flight period of the insect in the study area. The MTP installed in November, concentrated a population potential of 57.901 females per hectare, equivalent to 5,4 times the population levels obtained in control plots with 10.701 females, demonstrating the potential of the MTPs to reduce populations of the pest.

In stands attacked by *Sirex*, knowing the population inside the infested trees would allow to estimate the potential number of adults of wasps per hectare, and prioritize management measures on the affected stands. To achieve this, it would be necessary to dissect all infested trees which requires enormous logistic resources. In this research, our goals were to build an optimal model that predicted the within-tree *S. noctilio* population. Additionally, we characterized the probability of infestation in height, along with the moisture content. In this context, we sampled 141 infested trees attacked by *Sirex* which were dissected completely in

sections of 1 m long and then models were developed to estimate the *Sirex* population within-tree. This was achieved by using as predicted variable, considering two to five logs extracted at different relative heights. The optimal model was found to predict the within-tree *Sirex* population using three logs of 1 m, extracted at 30%, 50% and 70% of the total height. In addition, an equation was generated to estimate the probability of *S. noctilio* infestation along the trunk. This was based on a generalized linear model, with logit transformation, which shows that the probability of *S. noctilio* infestation along the trunk, for all ages, increases directly as a function of height from the ground, associated with a decrease in bark thickness. Both models were the first ever to be developed for *S. noctilio* infesting *P. radiata* trees. Moreover, we obtained a pattern for moisture content variation in height for attacked and healthy trees, confirming that it decreases as the total height of infested trees increases. The threshold value for larvae survival was 40% of moisture content.

Finally, we also evaluated the effect on the parasitism of *D. siricidicola* varying the number of inoculated nematodes on recently infested plantations in the Biobío region. Two trials were installed on sites located in Quilaco - Biobío region. The nematode *Deladenus* was inoculated with two methods; increasing the number of nematodes in the doses or increasing the number of holes per tree, inoculating equal amounts of nematodes per hole with this method. With the first method, using a dose six times higher than the standard (6X), an average parasitism of 84.6% was registered. This was significantly higher than the method of non-inoculated trees (29,5%) and that of treatment with half of the doses (55.5%). With the other method, increasing four times the dose (4X) yielded a parasitism rate of 74,3% in one of the sites (La Dicha), which was 26,7 percentage points higher than the treatment standard of 1 dose (1X), and 40 percentage points higher than that of non-inoculated trees. However, the response was not consistent in the other site (El Quillay), obtaining similar rates of parasitism for the doses of 1X, 2X or 4X, which on average reached 79,2% resulting in 54,7 percentage points higher than the control treatment. With these results, the conclusion is to inoculate a 6X increased dose, equivalent to 1.45 million nematodes per tree. The other method of increases inoculation holes should be discarded, due to higher costs and complicated logistics.

1.INTRODUCCIÓN GENERAL

Sirex noctilio: Aspectos generales de su biología, ecología y manejo

Sirex noctilio Fabricius es una avispa originaria de Europa, norte de África y norte de Asia, que en su rango de origen es considerada una plaga secundaria de coníferas (Spradbery and Kirk 1978). Sin embargo, estas especies cuando forman monocultivos y son establecidas fuera de sus rangos naturales de crecimiento o en hábitats con ambientes distintos, pueden ser más susceptibles al daño por plagas (Waring 2005), como es el caso de las plantaciones exóticas de *Pinus* spp. en el hemisferio sur, donde *S. noctilio* es una de las plagas más importantes que afectan a *Pinus radiata* D. Don (Hurley *et al.* 2007, Collett and Elms 2009, Carnegie and Bashford 2012). Su establecimiento ha causado significativos impactos económicos sobre estas plantaciones comerciales, los que se estiman en cientos de millones de dólares en los países donde se introdujo (Morgan and Steward 1966, Hurley *et al.* 2007). Sus efectos han sido sobre la mortalidad de árboles, degradación de la calidad de madera y/o mayores costos de control (Madden 1975, Neumann *et al.* 1987, Bain *et al.* 2012, Hurley *et al.* 2012, Klasmer and Botto 2012).

A Chile se introdujo el año 2001 sobre rodales aislados y cortinas cortavientos de *P. radiata*, ubicadas en localidades de las regiones de Valparaíso (32°1´S) y Los Lagos (40°15´S), ambas regiones con escasa presencia de plantaciones de esta especie. Posteriormente, se dispersó por todo el territorio, a una tasa estimada de 32 km/año (Lantschner *et al.* 2013), cubriendo actualmente el rango completo de plantaciones de *P. radiata* en Chile (SAG 2018), alcanzando 1,39 millones de hectáreas al año 2016 (INFOR 2018). Su establecimiento en algunas zonas ha significado daños significativos en algunos rodales, con niveles de ataque que han llegado hasta 50% (Beéche 2012). Evaluaciones de la infestación efectuadas en algunas comunas de Biobío, muestran evaluaciones anuales que varían entre 0,3% hasta 11,6% durante el período 2012 – 2017 (Castillo *et al.* 2019). Villacide y Corley (2012) muestran que cuando se sobrepasa el 5% de nivel de ataque, se entraría a niveles epidémicos de la plaga, asociado con irrupciones poblacionales que podrían causar mortalidad significativa de árboles (Neumann *et al.* 1987, Madden 1988). Estas infestaciones además pueden estar relacionadas con el déficit

hídrico que afecta a las plantaciones en el período estival, sobre todo en la zona centro norte (Huber and Trecaman 2004), aumentando la susceptibilidad de los árboles al ataque de *S. noctilio*, que prefiere atacar árboles estresados (Madden 1977, Neumann *et al.* 1987). Coincide además este período de mayor estrés hídrico con el ciclo de emergencia de *S. noctilio* en Chile, que se produciría entre diciembre y abril (Rojas and Beéche 2010).

Sirex noctilio es la única especie de la familia *Siricidae* que es capaz de causar la muerte de los árboles atacados, debido a que las hembras producen un mucus fitotóxico que es inoculado en conjunto con el hongo simbiote *Amylostereum areolatum* (Chaillet) Boidin, que además constituye fuente alimenticia para el desarrollo de las larvas de *Sirex* (Talbot 1977). La acción sinérgica de ambos acelera la condición de estrés del árbol atacado y otorga a las hembras de *Sirex*, la capacidad de debilitar los mecanismos de resistencia del hospedero a través de repetidas inoculaciones sobre árboles sanos (Madden 1974, Spradbery 1977). Por otra parte, los árboles estresados son más susceptibles al ataque de *S. noctilio* (Madden 1968). Esto se debe a que usualmente, estos árboles cuando están sometidos a perturbaciones externas alteran algunas de las funciones de la planta como la translocación (Nielsen and Orcutt 2000), causando un aumento en la transpiración y respiración del floema. Ello provoca incrementos en la permeabilidad del tejido, y en las tasas de pérdida de la presión de vapor y de volátiles emitidos a través de la corteza (Madden 1977, Madden and Coutts 1979), generando en consecuencia señales químicas que favorecen la atracción de las hembras de *S. noctilio* hacia estos árboles (Boroczky 2012) y facilitando la ovipostura sobre el floema (Spradbery and Kirk 1981, Neumann *et al.* 1987).

Las larvas del insecto tienen hábitos xilófagos y su ciclo de vida puede durar desde uno a tres años (Ryan and Hurley 2012), dependiendo de la temperatura y humedad ambiental. Madden (1981) determinó mediante un modelo fenológico que *S. noctilio* requiere 2500 días grados (DG) para completar su desarrollo, con una temperatura umbral de 6,8°C. Sin embargo, Nahrung (2017) recalculó el requerimiento termal para el desarrollo de huevo a adulto, a 1973 DG con 5,1°C de umbral. Este valor es consistente con los obtenidos por Myers *et al.* (2014) sobre *P. sylvestris* en laboratorio (1477 DG, 6,8°C) o por Haavik (2013), que obtuvo 10% de

emergencia de hembras de *Sirex* con 1280 DG y temperaturas umbrales de 0°C y 25°C en Ontario, Canadá. Según estos antecedentes, en Canadá la avispa podría presentar una generación anual (Ryan *et al.* 2013), de manera similar a lo observado en la zona sur de Chile.

Dentro del género *Pinus* existen variaciones en la tolerancia o resistencia de las especies al ataque de la avispa. *P. ponderosa* por ejemplo es menos atacado que *P. contorta* en la Patagonia argentina, probablemente debido a diferencias en las barreras físicas y químicas (Lantschner and Corley 2015). *P. radiata* también en el hemisferio sur es considerado una de las especies susceptibles al ataque de *Sirex* (Hurley et al 2007), como lo demuestran las enormes pérdidas causadas en Australia por la plaga (Haugen and Underdown 1990). En el hemisferio norte *P. sylvestris* junto con *P. resinosa* son considerados hospederos preferidos, respecto a *P. strobus* o *P. banksiana* (Haavik *et al.* 2017). Dado que las especies de *Pinus* spp., muestran distintas susceptibilidades a la avispa, la silvicultura es un aspecto clave para modular las respuestas de cada especie en particular. Está demostrado que ausencia de manejo (raleos) en plantaciones comerciales, causa un aumento de la competencia intraespecífica incrementando el stock de árboles estresados y de árboles suprimidos, considerados factores críticos en erupciones poblacionales de la avispa (Neumann *et al.* 1987, Madden 1988, Doods *et al.* 2010). Asimismo, postergar podas y raleos durante el ciclo de vuelo del insecto, reducir los daños causados por actividades silvícolas (cosechas y raleos) y la ejecución de cosechas sanitarias sobre árboles dañados por causas bióticas o abióticas, son medidas deseables en el manejo silvícola de la plaga (Haugen 1990, Villacide and Corley 2012).

Cuando un árbol es atacado por la avispa, se manifiestan varios síntomas que incluyen la resinación, una respuesta defensiva de los árboles a la oviposición de *Sirex* (Ryan *et al.* 2013), la clorosis y amarillamiento del follaje, que reflejan la acción del mucus fitotóxico (Bordeaux and Dean 2012) o del hongo *Amylostereum* (Coutts 1969). La presencia de orificios circulares de emergencia de 3 a 7 mm de diámetro en los árboles colonizados, es uno de los signos de la infestación por *Sirex* (Neumann *et al.* 1987). Sin embargo, a pesar que el monitoreo terrestre es un eficaz método para detectar árboles atacados por *Sirex*, no siempre la presencia de flujos de resina en el tronco, asegura que el árbol se encuentra infestado o colonizado por *S. noctilio* (SAG

2005). La razón es que la inoculación de mucus fitotóxico y/o artrosporas del hongo simbiote en un árbol, sin haber colonización de larvas, provoca los mismos síntomas que un árbol infestado (Madden 1977). Por tal razón la determinación del nivel de infestación o número de árboles colonizados por *Sirex*, sólo podría efectuarse mediante un muestreo destructivo de los troncos (Eager *et al.* 2011).

La determinación del nivel de ataque, infestación y mortalidad causada por poblaciones de *S. noctilio* en plantaciones de *Pinus* spp. es crucial para el manejo de la plaga, porque permite evaluar el impacto sobre los rodales afectados (NSCS 2002) y de esta forma, establecer los respectivos escenarios de riesgo que priorizaran las actividades de manejo y control (Haugen and Underdown 1990). Entre los métodos de monitoreo se encuentran los árboles trampas o parcelas centinelas, la vigilancia aérea con aeronaves y la vigilancia terrestre, que normalmente se realiza evaluando parcelas o transectos instalados por unidad de superficie (Carnegie *et al.* 2005). En las parcelas terrestres los árboles se clasifican como sanos, atacados o muertos, basado en los síntomas y signos presentes (Neumann *et al.* 1987). Incluso, es posible estimar si la mortalidad de los árboles asociada a *S. noctilio*, es de la temporada actual o corresponde a otras anteriores, mediante la observación detallada de los orificios de emergencia de los adultos (Corley *et al.* 2007). Con toda esta información se elaboran mapas de incidencia y también de riesgo, que facilitan y priorizan la ejecución de actividades de manejo o control. Sin embargo, no permite conocer la densidad de la población presente en los rodales infestados, que puede ser fundamental para escoger las mejores opciones de control.

Opciones para la detección y control de S. noctilio

El control de las poblaciones de *S. noctilio* se realiza utilizando métodos biológicos, como la inoculación del nematodo parásito *Deladenus siricidicola* Bedding (Nematoda: Neotylenchidae) (Bedding 1974) dentro de árboles atacados, la liberación de insectos parasitoides de huevos y larvas de *Sirex* (Collet and Elms 2009) y/o aplicando herramientas silvícolas como el raleo o la cosecha sanitaria (Neumann *et al.* 1987; Iede *et al.* 2012). Por otra parte, el uso de control químico no es viable en la actualidad, tanto por las restricciones que

imponen las certificaciones ambientales (FSC 2013), como por su ineficacia para controlar poblaciones de adultos (USDA 2008). Sin duda el control biológico es la mejor opción, porque es autosustentable, pero requiere tiempo para implementarse y ser eficaz (DeBach and Rosen 1991). Además, su eficacia está sujeta a variaciones en el tiempo debido a factores ambientales, biológicos, genéticos, etc. Por ejemplo, en el control de la avispa en Australia, la cepa de *Deladenus* utilizada para crianza masiva se tornó defectiva, debido a su permanente fase micetófaga debido a los múltiples repiques efectuados en laboratorio, perdiendo su capacidad de virulencia o infectiva para penetrar las larvas de *Sirex* dentro del árbol (Bedding 2009, Carnegie and Bashford 2012).

Otra opción de control menos desarrollada es la etológica, que implica el uso de trampas artificiales o dispositivos que atraigan a una población utilizando feromonas sexuales, atrayentes y/o kairomonas (Metcalf and Metcalf 1992). También incluye trampas biológicas, como son los árboles trampa o centinelas utilizados para la detección temprana de *S. noctilio* (Neumann 1982). El uso de trampas artificiales ha estado limitada al monitoreo de poblaciones de *Sirex*, valiéndose de kairomonas como atrayentes en trampas de distinto tipo, cuyos componentes han sido mezclas de alfa o beta - pineno con etanol (Bashford 2008, Haavik *et al.* 2014, Hurley *et al.* 2015, Hartshorn *et al.* 2015). También se han identificado algunos compuestos que actúan como feromonas, como una sexual que fue aislada desde la cutícula hembras de *S. noctilio* y que atrae a los machos para facilitar la cópula de las avispas (Boroczky *et al.* 2009), o una de agregación que atrae a hembras y machos cuando son expuestos a la pluma de olores (Cooperband *et al.* 2012). Sin embargo, los resultados de su aplicación a nivel operacional muestran bajos niveles de captura de *S. noctilio* (Zylstra *et al.* 2010, Bashford y Madden 2012, Dodds y Groot 2012,), pareciendo ser más efectivas como herramienta de detección, sobre todo cuando hay bajos niveles de población (Hurley *et al.* 2015). En consecuencia, el uso de trampas artificiales para captura masiva de adultos, estaría limitada por la ausencia de feromonas efectivas o atrayentes semioquímicos específicos para el insecto (Böröczky *et al.* 2009, Crook *et al.* 2012), impidiendo de esta forma contar con una herramienta que permita reducir poblaciones de hembras de *S. noctilio*.

Una variante más exitosa, que ha utilizado la etología como herramienta para la detección de *S. noctilio*, ha sido el uso de árboles trampas o árboles centinelas. Estos consisten en árboles debilitados a través de su anillado (Madden 1971) o por inyección de herbicidas sistémicos en el tronco (Neumann *et al.* 1982). Este último método se masificó como la técnica más utilizada en el mundo, debido a su eficacia, facilidad de uso y homologación de dosis (NSCS 2002, SAG 2008, Zylstra *et al.* 2010, Beéche *et al.* 2012, Nahrung *et al.* 2015). Ambos métodos, sin embargo, provocan una respuesta similar de estrés gradual y creciente en los árboles tratados, los que reaccionan emitiendo volátiles al ambiente. Entre las sustancias emitidas se han identificado entre otros compuestos, a los monoterpenos α -pineno y β -pineno, que actúan como kairomonas atrayendo hembras de *S. noctilio* hacia esos árboles (Madden 1977, Crook *et al.* 2012). Los árboles trampa, además de ser utilizados como método de detección, se utilizan para el control biológico mediante la inoculación del nematodo *D. siricidicola* en estos árboles, alterando el órgano reproductivo de *S. noctilio* y causando infertilidad en las hembras por atrofia de los ovarios (Bedding 2009). La eficacia de este método depende en gran medida, de su capacidad de atracción y de la época de instalación de los árboles trampa, que debe sincronizar el ciclo de vuelo de las hembras de Sirex con el nivel de estrés alcanzado por el hospedero (Zylstra *et al.* 2010). No obstante, la capacidad demostrada de los árboles trampa de atraer e inducir la ovipostura de hembras de Sirex, no está respaldado por antecedentes publicados, el uso masivo de éstos como herramienta de trampeo masivo, que logren reducir poblaciones de Sirex en las áreas infestadas, así como de cuáles serían las mejores épocas de instalación de árboles trampa, para maximizar las oviposturas de las hembras y por ende, capturar la población futura de Sirex.

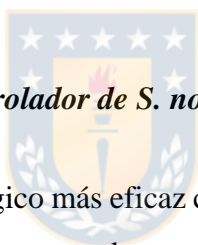
Cuantificación de poblaciones de Sirex dentro de los árboles

Para el caso particular de *S. noctilio* los esfuerzos de control tendientes a reducir el ataque o mitigar su dispersión hacia rodales sanos, no han considerado como variable la densidad poblacional del insecto, limitándose a considerar los árboles atacados o sintomáticos como el objeto de control (Carnegie *et al.* 2005, Haugen and Underdown 1990). Sin embargo, intervenciones como inoculaciones de nematodos o raleos sanitarios efectuadas sobre estos

árboles puede limitar la acción de control, porque una proporción de los árboles sintomáticos no se encuentran colonizados. En algunos rodales atacados de *P. radiata* en la zona centro sur de Chile, la proporción de árboles sintomáticos que se encuentran colonizados por Sirex puede llegar a ser hasta 30% del total, con un promedio cercano a 75% (datos del autor, no publicados). Por otra parte, si se conoce la población de la plaga dentro del árbol y se conoce el número de árboles infestados, se podría estimar su población potencial presente en las plantaciones atacadas de un área geográfica determinada (Crook *et al.* 2007). Esta información junto con la distribución espacial de *S. noctilio* dentro del hospedero y la identificación de los factores que limitan esa distribución, permitiría diseñar muestreos óptimos de población en árboles infestados (Eager *et al.* 2011), entendiendo un óptimo como el menor número de muestras que permita obtener resultados estadísticamente fiables. También, permitiría optimizar las inoculaciones concentrándolas por ejemplo en las zonas del árbol donde se concentra la mayor proporción de larvas (Penteado *et al.* 2000), o conocer en que sección del árbol cohabitan parasitoides u otros insectos acompañantes de Sirex (Ryan *et al.* 2011).

Usualmente, la información de densidad poblacional en árboles infestados por *S. noctilio* se obtiene de una temporada a otra, mediante muestras de trozos seccionados de árboles infestados, que son colocados en cámaras de crianza, colectándose información de los adultos emergidos en la temporada (Hurley *et al.* 2008). Sin embargo, no permite tomar decisiones sobre el control de la población del insecto en la misma temporada. De ahí la importancia de determinar un método de muestreo, que permita conocer la densidad de población de *S. noctilio* en arboles infestados de *P. radiata*. En caso de usar un censo para cuantificar la población de un insecto xilófago dentro de un árbol, implicaría cortar, transportar y disectar árboles enteros. La información sería muy precisa, pero impracticable a escala masiva u operacional por el consumo de tiempo y costos asociados (Fierke *et al.* 2005a). Por esta razón se han desarrollado modelos predictivos, que sobre la base de muestreos extensivos y con un número limitado de muestras, efectúan estimaciones de la población total del agente (Fierke *et al.* 2005b). Estos modelos generalmente se construyen sobre la base de varias muestras de trozos, tomadas a distintas alturas y se compara la población estimada por varios conjuntos de muestras, con la población censada en el árbol. Los modelos que se han utilizados para hacer estimaciones de

densidad poblacional con muestreo de trozas al azar o sistemático, son regresión lineal con covariables, regresión zero-inflated Poisson y estimadores insesgados (Fierke *et al.* 2005a, Crook *et al.* 2007). Para *S. noctilio* se desarrolló un modelo predictivo que estima la población del insecto dentro del árbol, utilizando como variables predictivas la población presente en combinaciones de trozas de 0,5 m ubicadas hasta una altura de 8,5 m (Eager *et al.* 2011). Sin embargo, este modelo desarrollado para *P. Sylvestris* y *P. resinosa*, podría no ser apropiado para su aplicación sobre *P. radiata*. Otra variante de modelos utilizados para estudiar distribuciones de población son los modelos lineales generalizados (Mora *et al.* 2007), especialmente los derivados de la distribución logística, donde las respuestas son dicotómicas como presencia o ausencia (Vittinghoff *et al.* 2012). Su aplicación, podría establecer cómo se distribuye el ataque de Sirex en un árbol infestado y cuál sería la probabilidad de encontrar ese ataque a una determinada altura.



Deladenus siricidicola* como biocontrolador de *S. noctilio

La tecnología de control biológico más eficaz contra *S. noctilio*, se desarrolló a partir del descubrimiento en Nueva Zelanda del nematodo parasítico *D. siricidicola* infectando larvas de Sirex, que posteriormente en su estado adulto se tornaban estériles. (Zondag 1962). El nematodo tiene un ciclo de vida dual, con una fase libre o micetófaga que vive en la madera y se alimenta del hongo *A. areolatum* mientras que, en la fase parasítica se introduce en las larvas de *S. noctilio* provocándoles esterilidad a las hembras (Bedding 2009). La determinación del ciclo, permitió desarrollar un sistema de crianza masal del nematodo, que reproducía la fase micetófaga de *D. siricidicola* en laboratorio. Las dosis producidas a fines de 1970, se aplicaron sobre plantaciones de *P. radiata* atacadas por *S. noctilio*, utilizando un martillo para perforar los puntos de inoculación y depositando los nematodos al interior del árbol, mediante una solución de gelatina al 12% (Bedding and Akhurst 1974). Este método se masificó en programas de control de Australia y Tasmania (Neumann *et al.* 1987, Haugen and Underdown 1993), hasta que la gelatina fue reemplazada por gel de poliacrilamida (al 1% < 600 u) como estándar a fines de los noventa en Australia (NSCS 2002) y Sudáfrica (Tribe and Cillié 2004), a mediados del 2000 en Brasil (Bedding and Iede 2005) y a fines de la década del 2010 en Argentina y Chile (Rojas and

Beéche 2010, Klasmer and Botto 2012).

La inoculación de las dosis de *D. siricidicola*, con gelatina o gel de poliacrilamida, se realiza mediante una inyección en orificios de aproximadamente 1 cm profundidad efectuados con un martillo inoculador (Neumann *et al.* 1987, Andrew 1990), que con un golpe extrae un tarugo y deja una perforación sin astillas. Eventualmente, el golpe ocluye los canales resiníferos constituyéndose en una limitante para el éxito de la inoculación del nematodo (Bedding and Akhurst 1974). En la inyección con gel, aproximadamente 2000 nematodos en promedio son depositados en cada orificio con un volumen de 1 ml (Haugen and Underdown 1993, Carnegie *et al.* 2005, Iede *et al.* 2012), variando entre 600 a 2500 nematodos por orificio (Haugen and Underdown 1993). Las dosis de 20 ml, puede contener desde 1 millón (Andrew 1990, Hurley *et al.* 2007, Croft *et al.* 2009) hasta cuatro millones de nematodos (Bedding 2009). Para estandarizar la densidad de nematodos inoculados, se homologó el número de puntos de inoculación sobre las trozas en función del DAP (Haugen y Underdown 1993). Con diámetros menores a 15 cm, se utilizó una perforación cada 30 cm de longitud y si el DAP es mayor a 15 cm, se aumentó a dos perforaciones cada 30 cm (Bedding 2009, Croft *et al.* 2009, Carnegie and Bashford 2012).

Un factor importante para el éxito del control biológico, es el número de nematodos inoculados, ya sea por concentración en la dosis o por cantidad de puntos de inoculación. Un exceso en el número de especímenes del biocontrolador, estimularía la competencia entre las larvas de *S. noctilio* con el nematodo *D. siricidicola* por el hongo simbionte *A. areolatum*, del cual ambos se alimentan (Bedding 2009), causando una disminución en la nutrición de las larvas junto con una reducción de su tamaño (Ryan and Hurley 2012). En consecuencia, estos adultos parasitados de menor tamaño tendrían una menor capacidad de vuelo, que limitaría la dispersión natural del nematodo (Villacide and Corley 2008). Sin embargo, esta condición no se ha constatado en Sudáfrica, donde los adultos parasitados han sido de mayor tamaño que los no parasitados (Hurley *et al.* 2008). En un experimento en que se varió la concentración de nematodos, inoculándose entre 1000 hasta 8000 por punto de inoculación (Bedding and Arkhurst 1974), se concluyó que 2000 nematodos es el umbral mínimo a ser inoculado, y a concentraciones mayores el nivel de parasitismo no presentó diferencias alcanzando hasta 90%

de nivel de parasitismo. Sin embargo, el experimento al carecer de un control que muestre la línea base de parasitismo natural, puede llevar a establecer conclusiones erróneas en la eficacia de los tratamientos.

La dinámica poblacional de *S. noctilio*, muestra como característica de la especie la ocurrencia de irrupciones poblacionales bajo la forma de pulsos eruptivos, donde se produce un rápido e impredecible aumento de la densidad poblacional (Berryman 1987). Una vez ocurrido pueden causar severas pérdidas por mortalidad de árboles (Madden 1975, Neumann *et al.* 1987) y su control podría requerir de años adicionales para su implementación, de no mediar enormes recursos logísticos en terreno (Haugen and Underdown 1990). Por otra parte, altos niveles de control biológico pueden decrecer en el tiempo debido a pérdidas de virulencia de las cepas multiplicadas en laboratorio (Haugen and Underdown 1993; Bedding and Iede 2005), especificidad de razas del nematodo a poblaciones específicas de *Sirex* y del hongo *Amylostereum* (Hurley *et al.* 2012, Slippers *et al.* 2012), variaciones del contenido de humedad (Hurley *et al.* 2008, Slippers *et al.* 2012), o efecto de variables ambientales que alteran el desarrollo del nematodo especialmente la temperatura (Yousuf *et al.* 2014). En consecuencia, frente a futuros aumentos poblacionales de *S. noctilio* o cuando la plaga está en fase de colonización, mientras antes sea implementado el control biológico se reducen las posibilidades de daño económico en las plantaciones. Una vía posible de dar celeridad al control biológico de poblaciones incipientes de *Sirex* con nematodos, es facilitar su establecimiento aumentando la cantidad de nematodos a inocular y evaluar su efecto sobre el parasitismo de la población de *S. noctilio*. Ensayos exploratorios realizados en plantaciones de la región del Biobío, muestran que al incrementar la dosis de nematodos inoculados hubo aumentos significativos en el parasitismo de hembras (datos del autor, no publicados).

Resumen nuevas opciones de manejo a evaluar

En esta investigación se aborda la problemática del control de *Sirex noctilio* en plantaciones de *Pinus radiata* en la zona centro norte de Chile, evaluando nuevas opciones de manejo de la plaga. Se utilizarán árboles trampa o centinela, agrupados en unidades de 1 ha

denominadas parcelas mega-trampas (PMT), para que actúen como trampas biológicas de hembras de *Sirex* induciendo sus oviposturas y comparando la población emergida con la de MTP control, compuesta esta última de árboles sin debilitamiento artificial. Conjuntamente se evaluará la mejor época de instalación, que maximiza las oviposturas de las avispa. Se espera responder las interrogantes siguientes: ¿Atraen las PMT una mayor población de hembras, que las que efectúan PMT de árboles naturales?, ¿cuál es la mejor época de instalación de las PMT, que favorezca un mayor ataque de *Sirex*?, ambas permitirán evaluar la eficacia de este novedoso método de control etológico, que no ha sido nunca probado como opción de manejo de la plaga.

Por otra parte, se evaluará la magnitud de la población de *Sirex* dentro de árboles infestados, utilizando modelos predictivos con tamaño de muestra óptimo. También, mediante muestreo de trozas cada 1 m en toda la longitud de tronco, se determinará la probabilidad de infestación de *S. noctilio* a lo largo del tronco, acorde a un modelo lineal generalizado y se establecerán cuáles son las variables que explican la distribución de esa población dentro de los árboles infestados. El uso de estos modelos junto con la información del nivel de ataque y parasitismo de la avispa, permitirá focalizar las opciones de control en las plantaciones infestadas al considerar la densidad poblacional de la avispa como variable dentro del manejo integrado de *Sirex*.

Finalmente, nuestra investigación plantea que es posible aumentar el nivel de parasitismo de *Sirex* por *Deladenus*, utilizando inoculaciones inundativas del nematodo en rodales con ataque reciente y con bajo nivel de parasitismo basal. Explícitamente las interrogantes establecidas son: ¿el aumento en la cantidad de nematodos inoculados, incrementa el parasitismo en una mayor proporción?, y en qué proporción aumenta el parasitismo evaluado en árboles inoculados, ¿respecto a árboles infestados sin inoculación? Todas estas interrogantes permiten establecer las hipótesis de investigación que serán abordadas en este trabajo:

HIPÓTESIS

Hipótesis 1: árboles debilitados en las parcelas mega-trampas (PMT), un mes antes (noviembre) del periodo de emergencia de *S. noctilio*, presentan un mayor nivel de ataque y una mayor población del insecto que árboles de las PMT debilitados en otros meses y que árboles sin debilitar de parcelas mega-trampas control ubicadas a más de cien metros.

Hipótesis 2: Utilizando modelos de regresión que relacionan la población de larvas de *S. noctilio* a distintas alturas del árbol, con su diámetro, altura total y DAP, se predice la población total de larvas en un árbol atacado

Hipótesis 3: Aumentos en la dosis del nematodo *D. siricidicola*, aumentan el parasitismo a adultos de *S. noctilio*

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar nuevas herramientas para el manejo integrado de *S. noctilio* en plantaciones de *P. radiata*

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de Parcelas mega-trampas (PMT) en la atracción de hembras de *S. noctilio* en rodales atacados de *P. radiata*.
2. Determinar el período de instalación de PMT que aumenta la atracción de hembras de *S. noctilio*.
3. Evaluar un modelo predictivo de poblaciones de larvas, dentro de árboles atacados de *P. radiata*.
4. Evaluar el efecto de inoculaciones inundativas de *D. siricidicola*, sobre el nivel de parasitismo de árboles de *P. radiata* atacados por *S. noctilio*

2. MEGA-TRAP-PLOTS: A NOVEL METHOD OF SIREX WOODWASP MANAGEMENT ON PINUS RADIATA PLANTATIONS IN CHILE

M.A Poisson, R Ahumada, A.O Angulo, F Muñoz and E Sanfuentes

Published as:

Mega-Trap-Plots: A novel method of Sirex woodwasp management on *Pinus radiata* plantations in Chile

M.A Poisson, R Ahumada, A.O Angulo, F Muñoz and E Sanfuentes. 2016

Southern Forest 2016, 78(4): 289-297

ABSTRACT

Sirex noctilio is one of most important invasive pests that affect *Pinus radiata* plantations in Chile. Its management is based on a biological control complex, the most important component of which is the nematode, *Deladenus siricidicola*. However, in some areas, *S. noctilio* populations reach epidemic levels and no effective control methods exist to reduce large populations in a short period of time. In this study, we evaluated a novel method called Mega-Trap-Plots (MTPs), which consist of an area of 1 ha with trap trees, which were debilitated in four different months (from November to February) with the purpose of reducing the Sirex wasp population through harvesting of trees attacked. The main objective was to reduce the potential population of *S. noctilio*, by evaluating four periods or months of MTP installation to maximize the colonization of trap trees by wood wasps. The results showed that the MTPs that were installed from November to January had the highest wood wasp infestation, which was coincident with the flight period of the insect. The trap trees were clearly attractive to *S. noctilio* females up to 90 days following their establishment. The MTPs that were established in November concentrated a potential population of 57,901 females of *S. noctilio*, which represents a population 5.4 times greater than that in the control, with 10,701 females. The population of *S. noctilio* attracted between November and January shows that the use of MTPs is an effective system for the management of wood wasps on plantations with a high level of infestation and thereby can reduce their spread and the attack of new trees within the same forest compartments.

Keywords

trap tree, mega-trap-plot, Sirex wood wasp, *Sirex* control, radiata pine plantations

1.- INTRODUCTION

The Sirex wood wasp, *Sirex noctilio* F. (Hymenoptera: Siricidae) is one of the most important invasive forest pests of *Pinus radiata* (D. Don) in the southern hemisphere (Hurley *et al.* 2007, Collett and Elms 2009; Carnegie and Bashford 2012). The wood wasp has caused significant damage in the countries where it has been introduced, due to tree mortality, degradation in wood quality, quarantine regulations and the cost of control (Madden 1975, Neumann *et al.* 1987, Bain *et al.* 2012, Hurley *et al.* 2012). Plantations with more than 5% of *S. noctilio* infestation are considered to represent an epidemic level, and are associated with outbreaks of the pest that can cause significant tree mortality (Villacide and Corley 2012), as was the case in Australia (Neumann *et al.* 1987, Madden 1988), South Africa (Hurley *et al.* 2007) and Argentina (Klasmer and Botto 2012).

Sirex noctilio was first reported in Chile on *Pinus radiata* trees during 2001 in two different localities: one in Guardia Vieja (32°51'43"S, 70°24'45"W) and the other in Ensenada (40°46'12"S, 72°24'15"W) (Beéche *et al.* 2012). The current distribution of *S. noctilio* is continuous between the El Maule region (34°48'16"S, 72°1'33"W) and the Los Lagos region (42°10'4"S, 72°11'18"W). *Sirex noctilio* is also present in the Metropolitan region (33°24'44"S, 70°37'12") and the Aysén region (47°04'23"S, 71°57'46"W) (SAG 2015). In these two regions, *P. sylvestris* stands have also been infested by *S. noctilio*, and to date, they are the only non *P. radiata* plantations infected by the wood wasp (Rojas and Beéche 2010). Epidemic levels of attack in radiata pine plantations have been reported in the Biobío region, with about 50% of trees affected in different plantations of the Alto Biobío locality (37°47'20"S, 71°45'16") (Beéche 2012).

Pinus radiata is the most important forestry plantation species in Chile, comprising about 1.5 million ha of the approximately 2.3 million ha of commercial forest (INFOR 2014). Its geographical distribution lies between the regions of Valparaíso (32°02'S) and Los Lagos (41°25'S) (INFOR 2014). In this latitudinal range, *P. radiata* differs in productivity, according to variation in annual rainfall (Flores and Allen 2004). During the summer season, an increase

in water stress occurs in plantations located in sandy soil areas (Biobío region, 37°14'S) as well as in the central valley in the northern area of the *P. radiata* distribution in Chile, where the dry period extends for up to six or eight months (Huber and Trecaman 2004). This long period of water shortage partly coincides with the *S. noctilio* flight cycle, which occurs approximately between December and April (Rojas and Beéche 2010) and which increases the susceptibility of the plantations to attack by wood wasps (Madden 1977, Neumann *et al.* 1987).

Sirex noctilio normally causes tree wilting and death, due to a combination of the phytotoxic mucus (Talbot 1977) and the *Amylostereum areolatum* fungus (Chaillet) Boidin, both of which are deposited by the females during the oviposition process (Madden 1977, Spradbery and Kirk 1981, Neumann *et al.* 1987). Management for *Sirex* control trap trees are used to attract *S. noctilio* females to stressed trees (Bordeaux and Dean 2012), via the artificial debilitation of trees by the injection of systemic herbicides into the tree stem (Neumann *et al.* 1982). As a response to herbicide action, organic compounds are emitted by the tree, which attract wood wasp females (Madden 1977, Crook *et al.* 2012). This method has been implemented in most of the countries where *S. noctilio* has been introduced (Hurley *et al.* 2007, Carnegie and Bashford 2012). Different methods exist to control the *S. noctilio* population, the most effective of which is the use of the parasitic nematode, *Deladenus siricidicola* Bedding (Nematoda: Neotylenchidae) (Bedding and Akhurst 1974, Corley *et al.* 2014), together with the parasitoid wasps *Ibalia leucospoides* Hochenwarth and *Megarhyssa nortoni* Cresson (Collett and Elms 2009, Fischbein and Corley 2014). Thinning with a phytosanitary purpose has also been performed in plantations infested by *S. noctilio* (Corley *et al.* 2007). Biological control agents require a long time to become successfully established (DeBach and Rosen 1991). The efficacy of *D. siricidicola* can decrease over time due to loss of aggressiveness, especially when the nematode is repeatedly reproduced under laboratory conditions (Bedding 2009). Moreover, its spread could be restricted, because the parasitized wasps are smaller and flying shorter distances than wasps unparasitized (Villacide and Corley 2008). Chemical control methods are not a feasible option, due to the low efficacy of insecticides on different stages of *Sirex*, as well as the environmental restrictions (FSC 2013). Ethological control using traps and lures have not been successful to date, due to the absence of an identified pheromone (Hurley *et al.* 2015) and the lack of knowledge concerning the behavior of the population of the wasp (Böröczky *et al.*

2009, Crook *et al.* 2012), which might explain the low capture of *S. noctilio* adults (Zylstra *et al.* 2010, Bashford and Madden 2012, Sarvary *et al.* 2014) limiting the implementation of mass trapping as an useful control technique (El-Sayed *et al.* 2006).

The trap trees colonized by *S. noctilio* are used for the inoculation of *D. siricidicola* (Bedding 2009). The objective is to detect areas of spread of *S. noctilio* and to facilitate the inoculation of the biological control with the nematode (Beéche *et al.* 2012, SAG 2008). Also, is important to monitor efficacy of nematode and parasitoids using billet monitoring of trap trees (Carnegie *et al.* 2005). Due to the presence of stands of *P. radiata* with epidemic infestation (> 5%) of *S. noctilio* and the absence or low levels of biological control agents in the Biobío region, this study aimed to validate the use of trap-tree plots of one hectare termed a Mega-Trap-Plot (MTP), with trees being debilitated by herbicide injection during four consecutive periods. The hypothesis of this study is that the MTPs concentrate the attack of *S. noctilio* females, reducing the *Sirex* population and thus, reducing the level of attack of the remaining trees in the stand, through the harvested of attacked trees before the *Sirex* flight season. The aim of this study was to evaluate the infestation level and the *S. noctilio* population obtained using MTPs, as well as the effect of the time (months) since their establishment.

2.- MATERIALS AND METHODS

2.1.- Area of study and establishment of Mega-Trap-Plots (MTPs)

The study was conducted between November 2010 and August 2011 in a thinned 19-year-old plantation of *P. radiata* that suffered attack by *S. noctilio* and was located to the east of Santa Bárbara town, in the Biobío region of Chile (between 37°43'13"S; 71°44'16"W and 37°46'12"S; 71°43'31"W). (Fig. 1). The area near the foothills of Los Andes, has a cold-to-temperate climate, with a daily temperature range from -5° to 37°C, and contains a mixture of native vegetation, agricultural crops and forestry plantations (Aguayo *et al.* 2009, Table 1). *Sirex noctilio* was detected in the whole study area in September 2010, with levels of attack up to 60% of the trees at the stand level. Given these attack levels, the Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) imposed quarantine regulations that required phytosanitary thinning, and restriction of the use

of logs for the production of pulp only, to ensure the destruction of the immature *S. noctilio* stages within the logs.

Table 1: Climatic conditions, soil and site characteristics of the plantations where the trials were located.

Climatic data ¹	Soil & Site characteristics ²		<i>P. radiata</i> plantation		
Average temperature (°C):	11.7	Soil type:	Sedimentary	Plantation age (years):	19
Average minimum temperature (°C):	5.7	Soil origin:	Volcanic ash	Area (ha):	469.1
Average maximum temperature (°C):	19.6	Soil texture:	Sandy loam	Site index (m):	32.2
Rainfall (mm year ⁻¹):	1,500	Altitude ³ (m.a.s.l.):	474.3	Density (trees ha ⁻¹):	367
Water stress index (mm year ⁻¹):	- 82.8	Slope (%):	14.1	DBH average (cm):	38.4

¹ Source: Quilaco weather station (37°40'08'' S, 71°59'60'' O). Dirección General de Aguas (DGA) - Chile. Data (1953-2013)

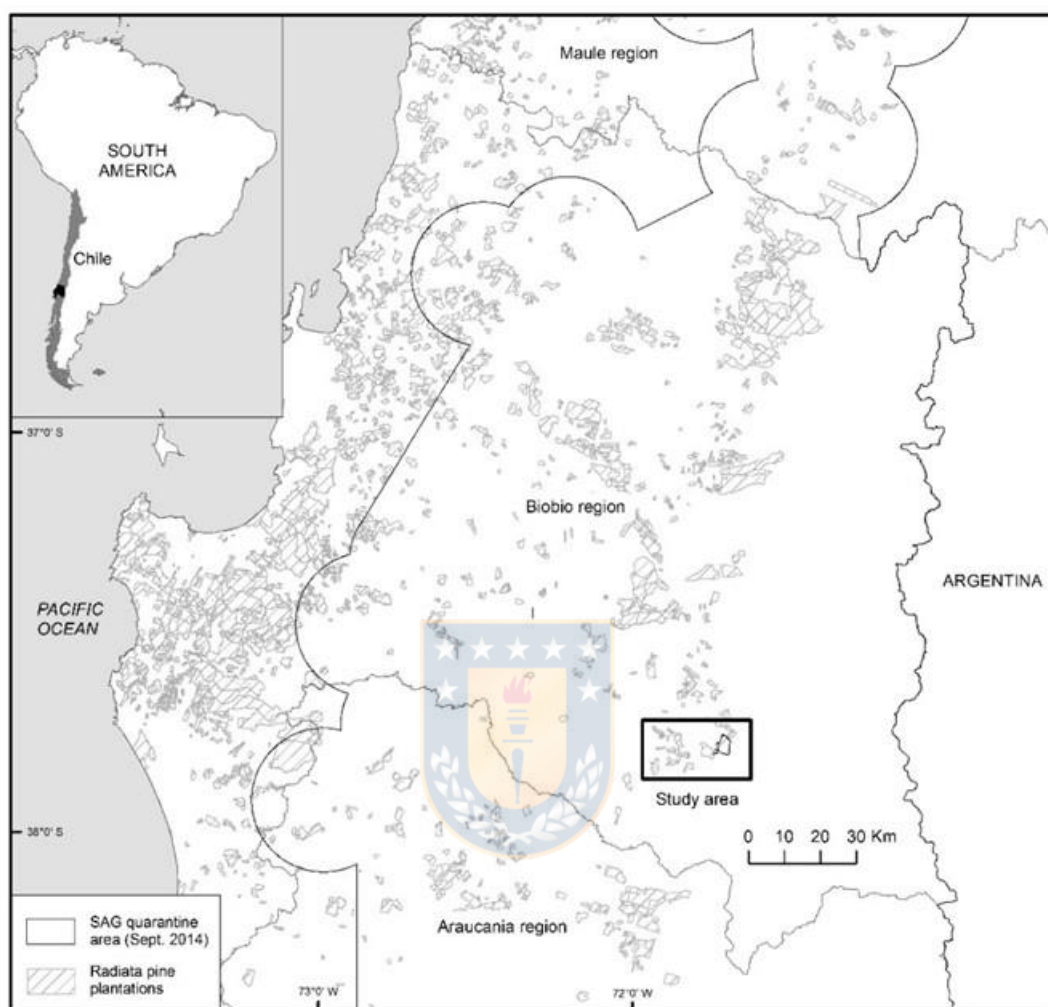
² Data: Servicio Nacional de Geología y Minas (SERNAGEOMIN) – Chile.

³ Meters above sea level

Eleven MTPs were established in the first week of November 2010. Each MTP corresponded to one ha, and the trees were stressed by applying a sub-lethal dose of herbicide to use as a trap tree. Each hectare was divided into four equal quadrants of 0.25 ha. (50 × 50 m) or treatments corresponding to four months of establishment. Each quadrant was randomly assigned one of the four treatments, established in the first week of each month (November 2010 to February 2011), (Fig. 2). The total number of treated trees was 3.812 (347 trees per MTP).

The herbicide used to debilitate the trees was the systemic herbicide *Tordon*® 24K (a.i. Picloram), which was injected into the tree stem following the standard procedure defined by SAG (2008), which means the use of 1 ml per each 10 cm perimeter, injected with syringe on holes made in the trunk by a portable drill. To quantify the effect of the MTPs, eleven control plots without herbicide injection were established, located at a minimum distance of 200 m from each MTP. The total number of untreated trees was 3.607.

Figure 1. Study area located in the Biobío region, Chile.

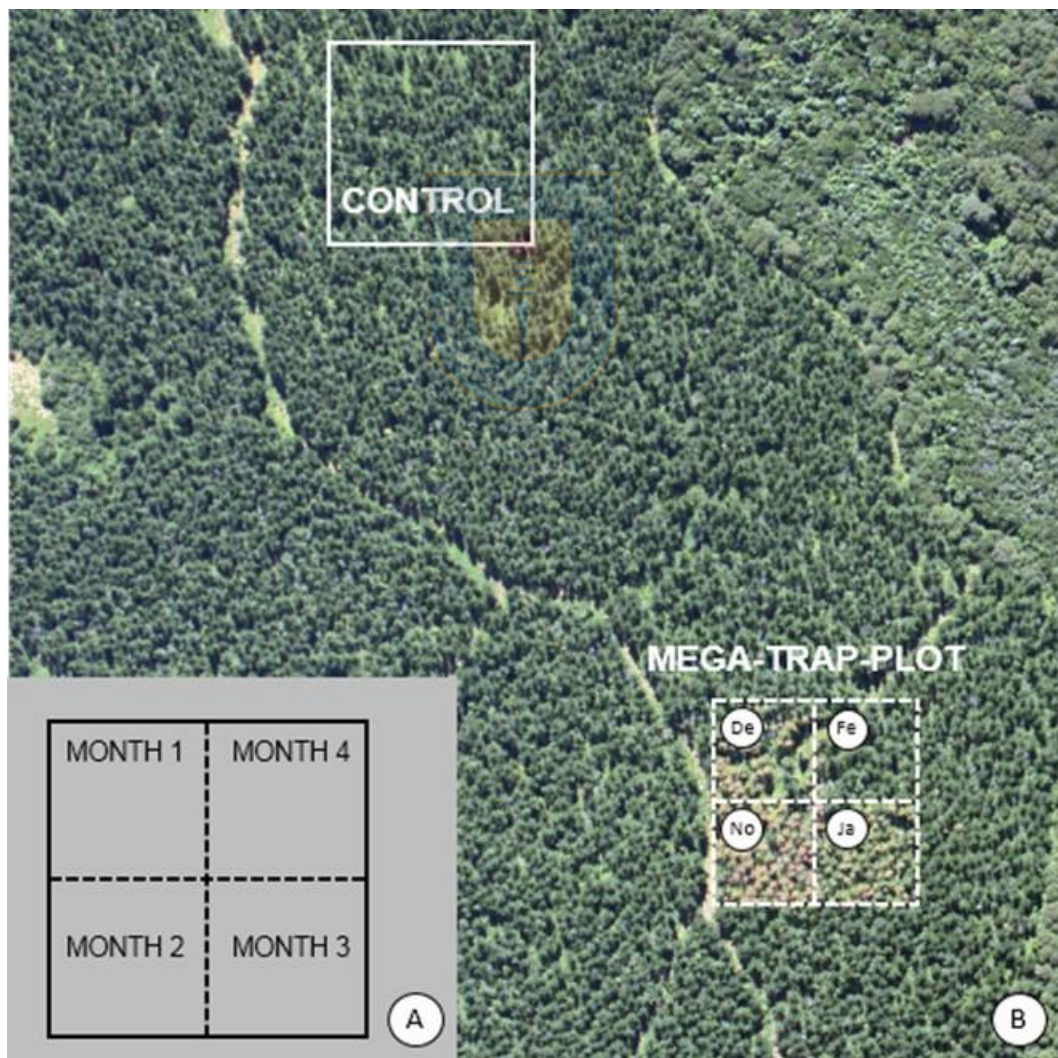


2.2.- Emergence period of *Sirex noctilio*

The establishment of the MTPs started one month before the *S. noctilio* flight period (Zylstra *et al.* 2010). It was assumed that the flight period in the area would be similar to that observed in the south of Chile (Osorno province, 40°35'46"S; 73°05'53"W), which extends approximately from December to April (Rojas and Beéche 2010). This assumption was validated by records of the emergence of *S. noctilio* adults from December 2010 to April 2011, provided by the Consorcio de Plagas Forestales (CPF S.A.), and those obtained from their breeding cages, which were installed in the same area of this study to evaluate the presence of

the *Ibalia leucospoides* parasitoid (C. Goycoolea, pers. com.). Data for the relative number of emerged wasps were also obtained from the same cages. The emergence data from these containers was complemented by the daily temperatures recorded between 1 October, 2010 and 1 August, 2011 at the Human station, located near to Los Angeles city (37°26'08"S; 72°14'38.3"W; 195 m a.s.l.), 53 km northeast of the study area.

Figure 2. A: Schematic representation of a mega-trap-plot four months after establishment. B: A mega-trap-plot located in a *Pinus radiata* plantation near (290 m distant) a control plot. Aerial view of a mega-trap-plot from February 2011.



2.3.- The attack level in the Mega-Trap-Plots

The percentage attack level in each mega-trap was calculated using the number of trees that were attacked or showed symptoms of *S. noctilio* and the total number of trees in the plot. Attacked trees were identified through *S. noctilio* characteristic symptoms such as the presence of resin beads and bleeds on the trunk, and staining caused by the fungus *A. areolatum* in the wood (Neumann *et al.* 1987, Dodds *et al.* 2010). Dead trees with the presence of emergence holes were considered to have been attacked by the insect in the previous season (Ismail *et al.* 2007) and were not included in the analysis. The level of attack was evaluated at the beginning of this study, in November 2010, and several subsequent evaluations were conducted at 30, 60, 90 and 240 days (July 2011), when the study ended. The number of healthy trees and those attacked by *S. noctilio* in each quadrant or treatment was recorded monthly and the trees affected by *S. noctilio* before the start of the treatment were not considered (Table 2).

2.4.- The infestation level in the Mega-Trap-Plots

The level of infestation was determined by confirming the presence of larvae or internal galleries in symptomatic trees and, required the destruction of the sample. The infestation level was defined as the number of trees colonized by *S. noctilio* as a percentage of the number of symptomatic trees. Infestation was evaluated in July 2011, prior to the harvest of the treatments, when the *S. noctilio* larvae and their galleries were easily recognizable.

The sampling of symptomatic trees from each MTP was completed in a set of four transects with five trees sampled per transect, totaling 20 trees per quadrant or treatment. Each transect was oriented towards the four cardinal points from the center of the each quadrant. From this center point, the sampling advanced following the first transect (north), until a symptomatic tree was found, which was then marked. This process was carried out until the next symptomatic tree was found and the same procedure was repeated for all the trees in each transect. Once the identification of symptomatic trees was completed, they were felled and were cut into sections one meter in length, starting from the base of the tree up to a minimum diameter of 5 cm. For each cut section, the presence or absence of larvae and/or galleries (containing compacted sawdust) was monitored on the face of the logs. At the first confirmation of larvae or a gallery,

cutting was suspended, and was continued on the next tree. In the quadrant established in February and in the control, the number of sampled trees was reduced to 12 (three per transect) and 16 (four per transect) respectively, due to the clear decrease in the number of symptomatic trees (Table 3).

2.5.- Estimation of larval and adult populations of *S. noctilio* in the Mega-Trap-Plots

The larval population of *S. noctilio* (z) was estimated from a sample of 20% of the trees found to be infested. The trees were marked in 1-m sections, from the base to a diameter of 5 cm, using an Artline® pen. All of the logs were cut, labeled and subdivided into three sections of 33 cm each. Each section was then carefully cut with an axe and the larvae were extracted using tweezers. The collected larvae of *S. noctilio* were counted, stored in 70% ethanol and were labeled with the number of the tree and the treatment for further analyses. The total larval population (w) was determined, and the larval population per hectare of *S. noctilio* (z) was estimated using the following function:

$$z \text{ (larvae ha}^{-1}\text{)} = y \text{ (\%)} * y_l \text{ (\%)} * w \text{ (larvae tree}^{-1}\text{)} * \text{density (trees ha}^{-1}\text{)}.$$

Where y = the percentage of trees scored positive for *Sirex* based on external characteristic and y_l = the percentage of trees confirmed positive

The potential population of adult females of *S. noctilio* (z_l) was estimated using the sex ratio of females to males obtained from the emergence in the breeding cages, assuming absence of mortality by parasitoids. The population of females per hectare (z_l) was calculated by multiplying the population of larva ha⁻¹ (z) by the sex ratio.

2.6.- Experimental design and statistical analysis

The level of attack (y) in the mega-traps was estimated with a completely randomized repeated measures design with a unifactorial structure of the treatments. The linear model of the response variable corresponded to:

$$y_{ijk} = u + t_i + r(t)_{ij} + p_k + tp_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

where Y_{ijk} is the k^{th} observation; u the mean total; t_i the fixed effect of i^{th} month of establishment ($i = 1, 2, \dots, 5$); $r(t)_{ij}$ the random effect of the j^{th} mega-trap ($j = 1, 2, 3, \dots, 11$) in the i^{th} month; p_k is the fixed effect of the k^{th} evaluation period ($k = 1, 2, \dots, 5$); tp_{ik} is the fixed effect of the interaction month \times period and ϵ_{ijk} is the random effect of the residuals.

The analysis was performed using the methodology of mixed models, with the MIXED procedure of SAS[®] 9.2. The normality assumption was verified with the statistical test of Shapiro–Wilk and when necessary, arc-sine transformation of the square-root ($\sin^{-1} \sqrt{y}$) was used, to transform the percentage values and meet the assumption of normality required by the mixed model. The compound symmetry covariance structure (CS), the unstructured covariance structure (UN) and the first-order autoregressive covariance structure (AR1) were modeled using an approach of restricted maximum likelihood (REML) (Littell *et al.* 1998). The most parsimonious model was selected, using Schwarz's criteria for the Bayesian information (BIC). The classification of means obtained in each treatment for the periods of study was conducted using the GLIMMIX procedure of SAS[®] 9.2, by comparing the mean differences of minimal squares.

Bayesian statistics were used to analyze the infested trees during the final period, assuming a random binomial distribution for this variable. For the proportion of infested trees (y_i), *a priori* Beta distribution was assigned. Using the software WinBUGS[®] (Bayesian Inference Using Gibbs Sampling), the Bayesian credibility interval was calculated for this proportion (π). The Gibbs algorithm was run for 11,000 iterations, using the first 1,000 iterations as burn-in.

The larval population of *S. noctilio* present in the infested trees (w) and the estimated potential population of adult females (z_1), was adjusted to the variance model:

$$w_{ij} = u + t_i + e_{ij}$$

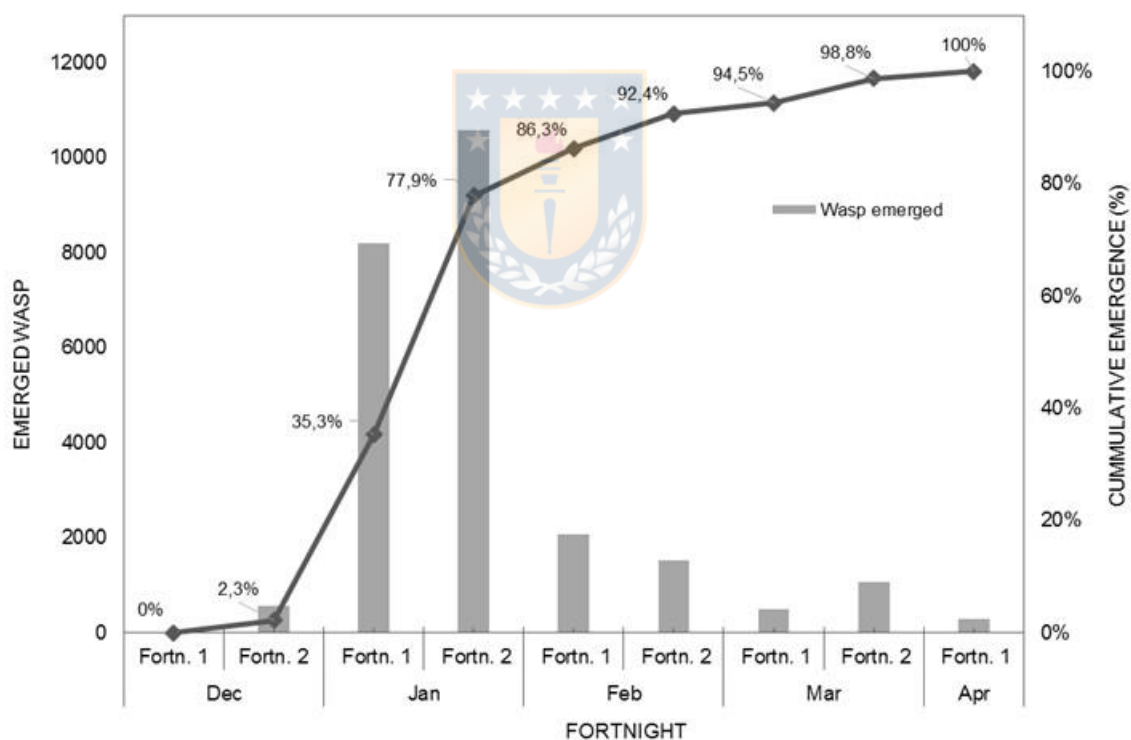
where, w_{ij} represents the mean value of the population at the i^{th} month, in the j^{th} mega-trap, u is the total mean and e_{ij} is the experimental error. The data were analyzed using the GLM procedure of SAS[®] 9.2. The transformation of the square-root ($\sqrt[2]{z}$) was applied, to comply with the normality assumption according to the Kolmogorof–Smirnof test. The mean differences were determined using the Tukey test.

3.- RESULTS

3.1.- Emergence period of *Sirex noctilio*

The emergence of *S. noctilio* adults between November 2010 and April 2011, showed that emergence started in December and extended until April (Fig. 3). The peak emergence was observed in January, which was 75.7% of the total, whereas February and March showed an emergence that was 16.8% and 6.3% of the total, respectively. The sex ratio was 1:0.56 males to females.

Figure 3. *Sirex* wasp emerged fortnightly from December 2010 to April 2011 in the study area and cumulative emergence (%).



3.2.- The attack level in the Mega-Trap-Plots

A total of 3,812 trees in the mega-traps and 3,607 trees in the control plots were evaluated during each period. The establishment of the MTPs in each month showed significant statistical differences in the level of wood wasp attack ($F_{4,44.7} = 2.02$; $p < 0.0001$), the effect of the

evaluation period ($F_{4,174} = 216.4$; $p < 0.0001$) and the interaction between both effects ($F_{16,174} = 42.14$; $p < 0.0001$). The month of mega-trap establishment interacted significantly with the period of evaluation (Table 2).

The evaluation conducted at 240 days after the establishment of the MTPs, showed that the highest level of attack was observed by those that were established in November, with 68.8%, followed by December with 66.5% and January, with 57.1%, with no significant differences among them. The level of attack in the treatment established in February was 21.9%, and was significantly different from the control, which showed an attack level of 27.5% (Table 2).



Table 2: Total number of trees attacked by *Sirex noctilio* in the Mega-Trap-Plots during the whole period of evaluation for each treatment. Mean \pm SE attack level (%) of *S. noctilio* considering all the trees in the Mega-Trap-Plots and trees effectively weakened by herbicide. The statistical analysis shown for each period of evaluation.

Evaluation period (day)	Treatments	Tree condition ¹		Sirex attack on all the trees (%)	Tree condition ²		Sirex attack on mega-traps (%) ³
		healthy	attacked		healthy	attacked	
Day 0	Control	3 607	0	0	3 607	0	0
	November	950	0	0	950	0	0
	December	926	0	0	926	0	0
	January	1 019	0	0	1 019	0	0
	February	917	0	0	917	0	0
Day 30	Control	3 499	108	2.99 \pm 0.29	3 499	108	3.11 \pm 0.29 a
	November	918	32	3.37 \pm 0.44	918	32	3.45 \pm 0.44 a
	December	902	24	2.59 \pm 0.38	902	0	0
	January	979	40	3.93 \pm 0.47	979	0	0
	February	894	23	2.51 \pm 0.56	894	0	0
Day 60	Control	2 932	675	18.71 \pm 3.10	2 932	675	19.53 \pm 3.10 a
	November	433	517	54.42 \pm 3.59	433	517	53.84 \pm 3.59 b
	December	491	435	46.98 \pm 4.12	491	411	44.50 \pm 4.18 b
	January	772	247	24.24 \pm 2.08	772	0	0
	February	632	285	31.08 \pm 4.90	632	0	0
Day 90	Control	2715	892	24.73 \pm 5.47	2715	892	26.21 \pm 5.47 a
	November	396	554	58.32 \pm 3.76	396	554	57.75 \pm 3.76 b
	December	340	586	63.28 \pm 6.10	340	562	60.69 \pm 6.23 b
	January	355	664	65.16 \pm 4.68	355	417	53.32 \pm 6.70 b
	February	567	350	38.17 \pm 6.48	567	0	0
Day 240	Control	2665	942	26.12 \pm 5.65	2665	942	27.57 \pm 5.65 a
	November	290	660	69.47 \pm 4.97	290	660	68.87 \pm 4.97 b
	December	287	639	69.01 \pm 6.00	287	615	66.54 \pm 6.14 b
	January	316	703	68.99 \pm 4.98	316	456	57.08 \pm 7.14 b
	February	488	429	46.78 \pm 7.39	488	79	21.98 \pm 8.64 a

¹ It includes all trees present in the mega-traps (with or without herbicide). Represent the sanitary condition (Sirex attack) of trees into the mega-trap-plot, for each evaluation period.

² Exclude trees which have not been treated, with the exception of the control.

³ Mean values with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$), according to least squares means.

3.3.- The infestation level in the Mega-Trap-Plots

A total of 748 symptomatic trees were harvested in the MTPs during the whole period of evaluation, and out of these, 538 trees (71.9%) were infested or colonized by *Sirex* (Table 3). In the control, 121 (55%) trees out of a total of 220 were infested. The Bayesian interval of credibility showed a level of infestation of 91% in November, 78.3% in December, 78.1% in January, although no significant statistical differences were observed among the months. However, significant differences were observed between the control, with 54.9% of infestation, and the MTP installed in February with 20.1% infestation, and the other treatments (Table 3).

Table 3: Number of symptomatic trees analyzed and Mean of infestation by *Sirex noctilio* in the Mega-Trap-Plots, to the end of the evaluation period (July 2011).

Treatments	Symptomatic trees harvested		Mean Infestation	SD	MC error ¹	Median	Credible interval	
	Total	Infested					2.5 %	97.5 %
Control	220	121	0.5494 a	0.0333	2.977E-4	0.5500	0.4821	0.6129
November	220	201	0.9100 b	0.0191	2.054E-4	0.9114	0.8692	0.9438
December	220	173	0.7838 b	0.0280	2.757E-4	0.7847	0.7268	0.8355
January	176	138	0.7813 b	0.0304	2.935E-4	0.7824	0.7187	0.8380
February	132	26	0.2011 c	0.0345	2.409E-4	0.2001	0.1375	0.2725

¹ MC error and the credible interval proportion (π) were calculated using Gibbs sampling.

Mean values with the same letter are not significantly different according to the Bayesian credible interval.

3.4.- Estimation of the larval and adult population of *S. noctilio* in the Mega-Trap-Plots

In the MTPs was significant the effect of the months on the larval populations of *S. noctilio* ($F_{4,50} = 32.65$; $p < 0.001$). The ranges obtained were from 101,938 larvae ha⁻¹ in November to 64,858 larvae ha⁻¹ in January. The control and February MTPs contained populations of 18,841 and 2,224 larvae ha⁻¹, respectively, which were significantly different (Tukey Test; $p < 0.05$) to those in the other treatments (Table 4).

Similarly, to larvae populations, the estimated total population of *S. noctilio* females showed significant differences between months ($F_{4,50} = 32.65$; $p < 0.001$). The highest number of adults were achieved in the mega-traps installed in November, with 57,901 females ha^{-1} , followed by December and January with 44,158 and 36,839 females ha^{-1} , respectively, without statistical differences between them. However, the mega-trap of February, which possessed a potential number of adult females of 1,263 ha^{-1} , differed significantly from the population in all other treatments. In the control mega-traps, the population of 10,701 females ha^{-1} also differed significantly from that in all other treatments (Table 4, Fig. 4), exhibiting a potential population of females 5.4-fold lower than that obtained in the mega-trap installed in November and 4.1-fold lower than those installed in December.

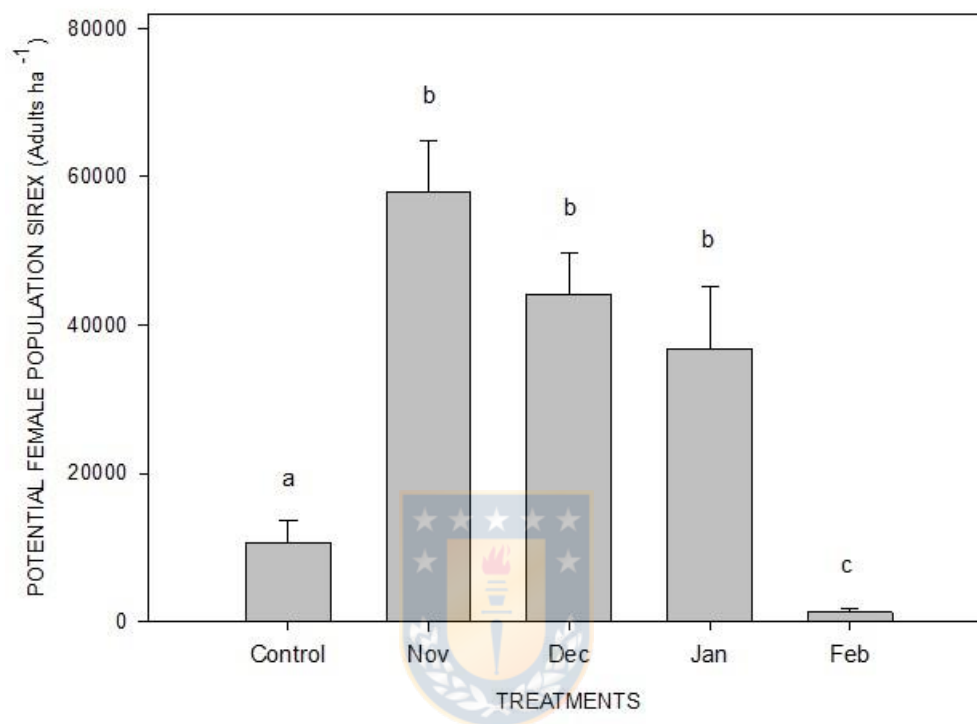
Table 4: Mean \pm SE *Sirex noctilio* larval population per tree and per hectare for each treatment. Estimation of the potential population of *S. noctilio* females (Mean \pm SE), according to attack level, infestation and larvae population.

Treatments	<i>Sirex</i> attack	<i>Sirex</i> infestation	¹ larvae tree ⁻¹	¹ larvae ha ⁻¹	^{1,2} <i>Sirex</i> female ha ⁻¹
Control	27.6%	54.9%	334 \pm 40 a	18,841 \pm 5,132 a	10,702 \pm 2,915 a
November	68.9%	91.0%	435 \pm 34 b	101,939 \pm 12,043 b	57,901 \pm 6,841 b
December	66.5%	78.4%	415 \pm 50 b	77,744 \pm 9,673 b	44,159 \pm 5,494 b
January	57.1%	78.1%	384 \pm 46 b	64,859 \pm 14,834 b	36,840 \pm 8,426 b
February	22.0%	20.1%	136 \pm 55 c	2,224 \pm 1,030 c	1,263 \pm 585 c

¹ Means values with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$), according to the Tukey test.

² The sex ratio used was 1:0.56 males to females. Assumed absence of mortality.

Figure 4. Potential population of *Sirex noctilio* females (adults ha⁻¹) for each of the treatments evaluated. Treatment values with the same letter are not significantly different (Tukey's test $p < 0.05$). Bars represent the standard error (SE).



4.- DISCUSSION

The efficiency of the use of MTPs to remove significant number of *S. noctilio* by harvesting and destroying the logs (pulp, sawn timber or any action to prevent the emergence of wasps) when the population was at an epidemic level was evaluated for the first time in Chile. At the final period of evaluation, the degree of attack by female *S. noctilio* was significantly higher in the quadrants corresponding to the first three months of MTP establishment, fluctuating between 69% in November to 57% in January, compared to 28% in the controls and 22% in the treatment establishment in February. These results could be explained by the degree of synchrony between the months of establishment of the MTP with the flight period of *S. noctilio* (Zylstra *et al.* 2010) and by the effect of the aggregation of the females of *S. noctilio* when they emerge and start to attack the trees (Corley *et al.* 2007).

The MTPs spatially concentrated trees that were weakened by herbicide in different months of establishment, and then they effectively attracted females of *S. noctilio* by emitting volatiles into the environment (Neumann *et al.* 1987, Boroczky *et al.* 2009). To overcome the resistance barriers of the tree, the females make repeated injections of phytotoxic mucus and inoculations of *A. aerolatum* spores to successfully oviposit (Bordeaux and Dean 2012, Ryan and Hurley 2012). In the MTP, these resistance mechanisms are inhibited by herbicide action and the degree of attack was greater in the months where the trees were exposed, from three to five months depending of the month of installation, to the females that were found flying within the area (Neumann *et al.* 1982, Zylstra *et al.* 2010). Consequently, the *Sirex* attack process in the MTP's control was slower than in the treated plot, due to the fact that they had not stressed by herbicide application.

The establishment period of the MTPs (November to February) affected the attack, infestation and the captured population of *S. noctilio*. In this study, a greater level of attack was observed by females that were concentrated between November and January and this seasonality was related to the flight period of the insect (Iede *et al.* 2012). The flight period in the study area occurred from December to April, which coincides with other records from Chile (Rojas and Beéche 2010), and resulted in the largest emergence percentage between January (75.7%) and February (16.8%). Mega-Trap-Plots were installed in November, December, January and February and were evaluated for attack by *S. noctilio* in December (30 days), January (60 days), February (90 days), March (120 days) and June (240 days). All these periods (days) were respect to the November treatment. In December, only 2.3% of the total population had emerged and the attack on the tree traps in November was only 3.1%. In January, the degree of attack on the mega-traps established in November and December was 53.8% and 44.6%, respectively.

The total attack on these traps increased by 3.9 and 16.1 percentage points between January and February. In contrast, the plots installed in January showed a 52.3% level of attack after 30 days. These values confirm that the tree traps installed one month before the flight period or at the beginning of it, exhibited the highest percentage of attack, similar to observations in the northern hemisphere (Zylstra *et al.* 2010). The MTPs established in February only reached a 22% level of attack by June (240 days), although the population of female *S. noctilio* was still 20.3% of the maximum observed in February and March. From the obtained

results, it follows that the MTPs are attractive to *S. noctilio* for at least 90 days from their establishment based on the results of attack obtained from November and December. The duration of this period might be related to various factors, such as tree species, the type of herbicide, its mechanism of action, the number of doses per tree and the environmental conditions. In Chile, the herbicide used for the MTP installation (Picloram) resulted in the gradual wilting of trees and not the rapid dehydration of trees (SAG 2008, Poisson and Ahumada unpublished data), which then caused the tree to die, thereby reducing the attraction of *S. noctilio* (Hurley *et al.* 2007). In our study were used an average of 12 ml tree⁻¹ of Tordon® 24K (3 g of Picloram). For up to 90 days (the start of February), the presence of dead trees with chlorotic foliage (reddish-brown) was not observed during the visual observations of the MTPs, which is a characteristic symptom of drying and tree death (Ismail and Mutanga 2010). In contrast, the creation of trap trees of *P. sylvestris* and *P. ponderosa* in the northeastern U.S.A using 0.96 mL Dicamba tree⁻¹ as a herbicide, showed chlorosis and death between the third and fourth weeks after treatment (Zylstra *et al.* 2010). In Australia, the application also of Dicamba to *P. radiata* trap trees resulted in mortality from the fourth month (Neumann *et al.* 1982), using an equivalent dose applied in Chile, before the herbicide was forbidden by FSC.

The degree of infestation and population of *S. noctilio* in the MTPs was closely related to the level of attack observed. The largest infestation occurred in the MTPs installed between November and January, which were also the periods when the greatest attack was observed. This can be explained by the highest exposure to females during their flight period within this period, and to the greatest susceptibility of trees that had already been weakened by the repeated inoculations of phytotoxic mucus and the spores of the fungus inoculated by the wasps (Zylstra *et al.* 2010, Bordeaux and Dean 2012). Repeated inoculations possibly represent one of the most important factors in the attack of *S. noctilio*. In a dynamic context of spatial aggregation, the probability of a large number of inoculations on the trees is increased, which affects the physiology of the tree and creates conditions for the optimal development of the *A. aerolatum* fungus (Corley *et al.* 2007, Slippers *et al.* 2015).

In the present study, the largest populations of larvae collected per hectare, were observed in the MTPs installed in November, when 101,938 specimens were collected. These tree traps were also exposed to attack by females for the longest period of time. In contrast, the

treatment installed in February yielded the lowest population, with only 2,224 larvae ha⁻¹ recovered at the end of evaluation period. This decrease in the wasp population in the MTP's of February might be because the trap trees were not sufficiently debilitated by herbicides for a successful attack by the female population to occur. In the control plots, the attack by *S. noctilio* was observed during the whole period but was possibly influenced by the mechanisms of resistance of the trees, which inhibited the successful colonization of the wasps (Madden 1977, Taylor 1981). The population of larvae in the control trees, which was 5.4-times lower than that in the MTPs in November, allow an estimate for that month of a potential population of 57,901 females, whereas that in the control only reached 10,701.

5.- CONCLUSIONS

This research has been the first to evaluate a method of *Sirex* management population, using Mega-Trap-Plots (MTPs) as a mass trapping system that increase the *Sirex* populations in a single large area then remove the future populations of wood wasp female, via harvesting the trap trees for use as pulpwood, before all the wasp emerge. This process is a classical method of ethological control and demonstrated the efficacy of the MTPs as a tool of *Sirex* management in stands of radiata pine plantations with epidemic level attack of the pest.

Mega-Trap-Plots can be installed over a three-month period (November to January) to synchronize with peak *S. noctilio* flight period without affecting the potential of attraction of the female's populations.

Mega-Trap-Plots could be used in an intensive biological control program, as a massive inoculation system for the nematode *B. siricidicola*. The efficacy of this method could be improved, installing MTPs that combine the best two months to attract the main population of *Sirex* females (November – December).

Further research is needed to assess the optimum size of the Mega-Traps-Plots, in terms of the number of trap trees to install monthly, and their optimum spatial distribution. The overall results of this study suggest that MTPs could be used as a novel method of *Sirex* woodwasp management in *P. radiata* plantations.

6.- ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Bioforest S.A. and Forestal Arauco for their financial and technical support. We also thank various colleagues including Mr R. Gómez, Mr M. Oliva, Mr A. Durán for their support and useful discussions that help the completion of this study. Mr P. Salas from Universidad de Concepción and Mr R. Saavedra for their assistance with statistical analysis and GIS work, respectively.



3. MODELING WITHIN-TREE POPULATION, INFESTATION PROBABILITY AND MOISTURE CONTENT FOR SIREX NOCTILIO AFFECTING PINUS RADIATA IN CHILE

Miguel A. Poisson, Cristián R. Montes, Juan J. Quiroga

Manuscripts submitted October 13. TTPM-2018-0294 Under Review. International Journal of Pest Management. ScholarOne Manuscripts.

ABSTRACT

There is little knowledge on predictive models that examine within-tree *Sirex noctilio* populations on infested *Pinus radiata* plantations in Chile. Additionally, no models have been developed to explain the probabilities of *S. noctilio* infestation along the stem. To bridge this gap, we modeled the within-tree distribution of *Sirex* woodwasp on 141 symptomatic radiata pine trees, from both juvenile and mature plantations. All trees were felled and cut in sections of 1-m bolts and, dissected to counting for woodwasp specimens. Also, on a sample of infested trees variation in stem moisture content was determined and compared with healthy trees. The most balanced predictive model was the equation including bolts extracted to 40%, 50% and 70% of the relative height. A logit transformed binomial regression model was the best to describe the probability infestation along the stem. The variables; tree age, bark thickness, and the total height were significant. We also found the moisture content along the vertical profile to follow a logarithmic trend, for infected and healthy trees, but opposite in direction from the relative height.

Keywords: invasive insects, *Sirex* within-tree, optimal sampling, predictive model, logit, larvae distribution, radiata pine, survey.

1. INTRODUCTION

Sirex noctilio Fabricius (Hymenoptera: Siricidae), also known as the *Sirex* woodwasp, is a conifer pest originally from Eurasia (Hurley *et al.* 2008) that was introduced in parts of the southern hemisphere and has caused significant economic losses in commercial pine plantations (Bedding and Iede 2005, Haavik *et al.* 2014). The *S. noctilio* attack is a physiological process

involving three steps: (1) injection of phytotoxic mucus to weaken trees (Bordeaux and Dean 2012); (2) inoculation of symbiont fungal spores of *Amylostereum areolatum* (Chaillet ex Fr.) Boiding (Russulales: Amylostereaceae) (Talbot 1977), which degrade wood and release carbohydrates that are the food source for larvae ((Madden 1981, Slippers *et al.* 2015); and (3) laying eggs concurrently during the former processes (Madden 1974). In stands attacked by the woodwasp, there are both symptomatic and infested trees by *Sirex* females. These trees are distinguishable only by the presence or absence of life stages of *S. noctilio*, which initiates an infestation when it successfully colonizes host trees.

In 2001, *S. noctilio* was introduced to Chile, and was found in forest stands around the regions of Valparaíso (32°1` S) and Los Lagos (40°15´). These two regions had low presence of commercial plantations of *Pinus radiata* D. Don. Subsequently, the woodwasp spread to commercial plantations in the rest of the territory, leading to a progressive infestation causing significant damage in some commercial stands (Beéche 2012). Currently, *S. noctilio* spans almost the entire range of radiata pine plantations in Chile (SAG 2018). The insect spreads actively through the flight of adult individuals, and females can fly up to 50 km/day (Villacide and Corley 2012). Also, the anthropogenic movement of logs or infested wood pieces causes a passive spread of the insect (Beéche *et al.* 2012, Liebhold and Tobin 2008). To reduce the negative impact of the pest in *P. radiata* plantations, usually control measures are implemented on the infested trees (Haugen 1990). The control of *S. noctilio* focuses on suppressing pest populations (Martinez *et al.* 2014), through classic methods such as:

1. Biological control through nematode inoculation, *Deladenus siricidicola* Bedding (Tylenchida: Neotylenchidae) (Bedding and Akhurst 1974; Hurley *et al.* 2008) and the release of the egg and larval parasitoids (Taylor 1978).
2. Silvicultural tools such as sanitary thinning and harvest of *Sirex*-infested trees (Haugen and Underdown 1990, Iede *et al.* 2012, Neumann *et al.* 1987).
3. Ethological control by mass trapping females using Mega-traps-plots (Poisson *et al.* 2016).

Control efforts to reduce *Sirex* spread to healthy stands do not consider the existing population density of *S. noctilio*, and, in most cases, only the proportion of symptomatic trees and mortality caused by the wasp is evaluated (Carnegie *et al.* 2005, Haugen and Underdown

1990). In general, the woodwasp population density can be estimated by the number of adults that emerge from bolts that are installed in breeding chambers (Hurley *et al.* 2008; Ryan *et al.* 2012). These include operations such as tree felling and transportation of infested sections (Long *et al.* 2012). However, the use of this indicator method keeps practitioners from an appropriate guide towards control actions, as it does not allow for the assessment of within-tree populations (Eager *et al.* 2011), providing only the next flight period of the wasp. The knowledge of the population density and the within-tree distribution pattern of *S. noctilio*, will allow biological control programs to be optimized, fine-tuning the number of parasitoids to be released (Eager *et al.* 2011; Ryan 2011) or the amount of inoculation of nematodes to be carried out on infested trees (Hurley *et al.* 2008; Penteadó *et al.* 2000).

Within-tree distribution patterns of *S. noctilio*, have been studied on many different pine species cultivated throughout countries where the woodwasp has been introduced. In North America, the population density was associated with stem diameter and bark thickness of *P. sylvestris* L. and *P. resinosa* Aiton (Eager *et al.* 2011). Other authors (Ryan *et al.* 2012), related it to the total height of *P. Sylvestris*, *P. resinosa*, and *P. banksiana* Lamb. trees. In Australia, the density of emerging wasps was correlated with the height of *P. radiata* used as trap trees (Neumann *et al.* 1982). Also, the same occurred with *P. taeda* L. in South America, where the density was expressed as a function of the height and relative diameter (Penteadó *et al.* 2000). In South Africa, researchers measured the moisture content of sections at different relative heights of *P. patula* Schiede & Deppe relating it with the population of adults emerging in the lower, middle and upper parts of the tree (Hurley *et al.* 2008).

One constraint to quantify within-tree xylophagous or phloeophagous insect populations is the required logistics, including the felling, transportation, and dissection of entire trees (Fierke *et al.* 2005; Crock *et al.* 2007). As a result, within-tree population assessments are expensive and are not feasible on an operational scale in forest plantations. On the other hand, these assessments have been used to build predictive models relying on whole-tree subsamples (Fierke *et al.* 2005). Predictive models to estimate the number of within-tree specimens of *S. noctilio* use bolts taken from different heights of the tree as predictive variables (Eager *et al.* 2011). The required sample size to build these predictive models varies according to the pest and host that is being studied. For example, estimating the density of *Enaphalodes rufulus*

Haldeman (Col: Cerambycidae) in *Quercus rubra* L. required dissecting 24 trees (Crook *et al.* 2007), whereas determining the density and distribution of *S. noctilio* larvae required twelve *P. resinosa* and six *P. Sylvestris* trees (Eager *et al.* 2011). The number of tree samples for dissection usually increases when it is associated with pest suppression or pest management activities. For *Agrilus planipennis* Fairmaire (Col: Buprestidae) colonizing *Fraxinus* spp., Foelker *et al.* (2013) dissected a sample of 58 trees, while Siegert *et al.* (2017) used the same technique with 208 trap trees of the same species.

In this study, we tested two different hypotheses dealing with *Sirex* infestations. The first hypothesis linked the probability of *Sirex* woodwasp to attack below a given threshold of the tree height, and the other related the presence of within-tree larval populations as a function of bolt height, diameter, bark thickness, and tree age. The research goals were to: 1) identify the vertical distribution pattern of *S. noctilio* on infested *P. radiata* and determine the relationships between the level of infestation and tree diameter, bark thickness, and age; 2) develop a predictive model to estimate the within-tree population of *Sirex* woodwasp in *P. radiata*; and 3) compare the stem moisture variation over the height of infested versus healthy trees.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1.- Study sites

Phytosanitary surveys of *P. radiata* plantations located in the Santa Bárbara area (Los Angeles province - Biobío region; 71°45´S, 71°53´W) were made to detect *Sirex* attacks in 2013. A total of twenty sites were sampled between August and September 2013. The sampling was done over an extensive area of ~500 km² (Figure 1). Selected sites had an average altitude of 498 ± 22.9 m.a.s.l. (meters above sea level). The surrounding landscape consisted of commercial plantations of *P. radiata*, native forest and, agricultural crops. The stands selected for this study were between five and twenty-three years old, with a plantation density varying between 260 and 1,311 trees/hectare (mean of 708.3 ± 357.5) with an average *S. noctilio* attack level of 12.5% ± 3.7%. The stands were classified into three age categories for sampling: juvenile: 5 to 12 years; intermediate: 13 to 18 years; and mature: older than 18 years, to represent the age distribution of attacked trees. A total of 141 attacked trees were sampled during the

season prior to *S. noctilio* emergence. The average sample tree diameter was 19 ± 6.5 cm, and average tree height was 18.1 ± 6.1 m (Table 1).

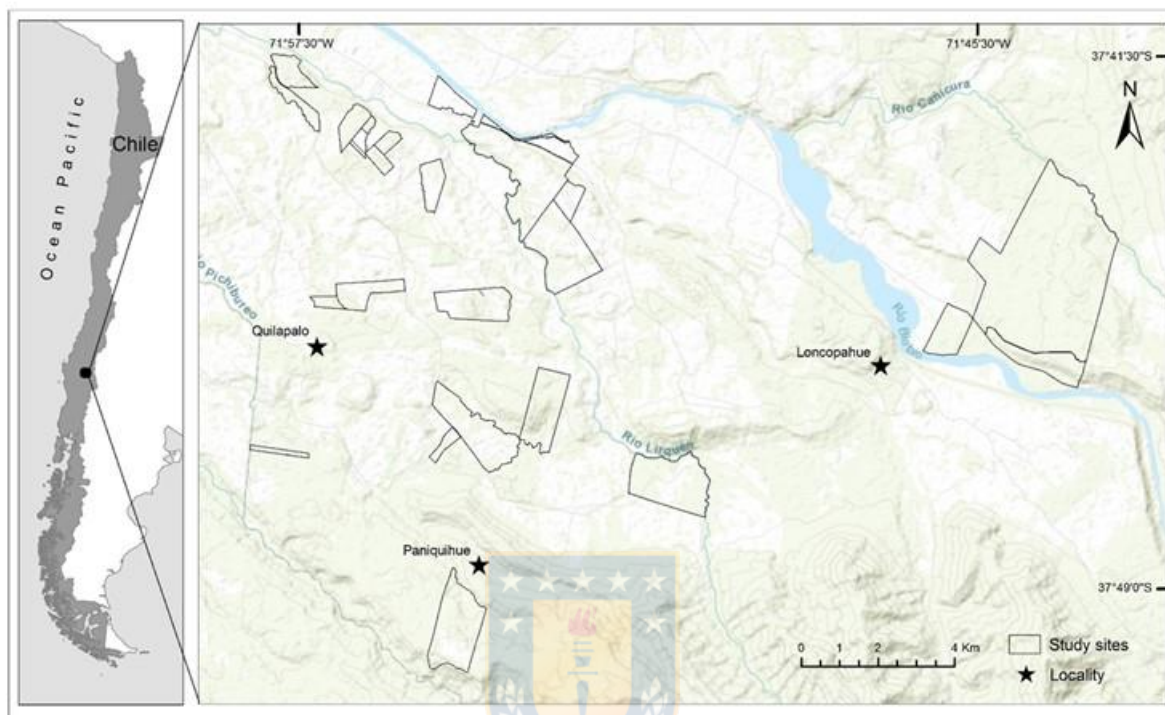


Figure 1. Geographic distribution of radiata pine plantations infested by *S. noctilio* near Santa Barbara locality, in the Biobío region in Chile.

2.2.- Sample Trees

Trees were selected randomly from infested individuals in each category: juvenile (n=39), intermediate (n=51), and mature (n=51). The sampling regime corresponded to an unbalanced design due to the lack of infested trees in juvenile age classes at the beginning of sampling. For a tree to be selected, it had to have the characteristic symptoms of *Sirex* attack: resin drops along the stem with small dripping flows (Ryan *et al.* 2013), and decay or foliar chlorosis caused by phytotoxic mucus and the fungal symbiont *Amylostereum areolatum* (Dodds *et al.* 2010; Neumann *et al.* 1987). Dead trees as a result of woodwasp attack in other seasons or stems with emergence holes were excluded from the sampling. Sampled trees were measured for diameter at breast height (DBH) and total height before they were felled. From each tree, 1-

m long bolts were cut and measured for the top and bottom diameters with a tree caliper. Also, the bark thickness was measured using a digital Vernier caliper on each end from each bolt. All bolts were labeled, transported and stored in a warehouse owned by Forestal Arauco, located in Santa Bárbara (37°45'27,02''S, 71°45'11,35''W). At these facilities, bolts were dissected to extract all the biological material. The larvae and other life stages of *S. noctilio* were counted, placed in vials with 70% ethanol, and sent to the Bioforest laboratory for their final identification.

Table 1. Summary statistics for all symptomatic trees sampled in various sites, divided into age classes.

	Age Class ^a	Number of trees felled	Mean (SE)	Standard deviation (SD)
Age (years)	Matures	51	20.3 (0.15)	1.08
	Intermediates	51	14.8 (0.29)	2.05
	Juveniles	39	8.3 (0.35)	2.16
Density (trees/ha)	Matures	51	411.8 (10.7)	75.4
	Intermediates	51	698.5 (50.8)	358.9
	Juveniles	39	1,108.9 (13.9)	85.6
Diameter at breast height (cm)	Matures	51	24.4 (0.71)	5.01
	Intermediates	51	18.4 (0.57)	4.05
	Juveniles	39	12.78 (0.7)	4.34
Height (m)	Matures	51	22.9 (0.55)	3.88
	Intermediates	51	19.3 (0.49)	3.43
	Juveniles	39	9.94 (0.49)	2.99
Sirex attack (%)	Matures	51	13.2 (0.6)	4.0%
	Intermediates	51	12.2 (0.6)	4.3%
	Juveniles	39	12.0 (0.3)	2.1%
Sirex density (Number of larvae/tree)	Matures	51	65.74 (8.71)	61.57
	Intermediates	51	72.37 (6.52)	46.13
	Juveniles	39	15.56 (2.62)	16.12

^a Juveniles: 5 to 12 years; Intermediates: 13 to 18 years; and Adults: older than 18 years

2.3.- Data Analysis

All statistical analyses were performed in the R statistical programming environment (R Core Team 2017) using the following packages: lattice (Sarkar 2008), latticeExtra (Sarkar and Andrews 2016), ggplot2 (Wickham 2009), MASS (Venables and Ripley 2002), bbmle (Bolker and R Core Team 2017), plyr (Wickham 2011), rgl (Adler D. and Murdoch D. 2018), and lmtree (Zeileis and Hothorn 2002). Additionally, where a deviation of variable y from normality was detected, we used the Minitab ® 15 software to improve the fit using Box-Cox transformation. We selected the best subset of variables using linear regression models to predict within-tree densities of *S. noctilio* larvae.

2.4.- Modeled within-tree population based on bolt subsamples taken at different heights.

Estimators were built for *Sirex* populations presence on attacked trees using the data from 141 sampled trees. Eight trees were excluded because of their lack of signs of *S. noctilio* colonization. The remaining 133 trees generated 2,097 bolts each of 1-m length, from which 1,067 were infested (50.9%) and 1,030 (49.1%) did not have insects present. The *S. noctilio* population density in the bolts was analyzed according to the relative height (x_i) of the bolt at the i th height (h_i), in relation to the total tree height (h_t). The estimate was based on the following formula: $x_i = h_i/h_t$. The results of x_i were further classified into 10 equidistant quantile classes. The relative height was used because it reduces the trees height variation.

The predictive model used the total number of *Sirex* woodwasps present on each 1-m bolt as the independent variable. This was taken from the base of each of the 10-relative height inter-quantiles, whereas the response variable was the whole individual stem population density of *S. noctilio* larvae. The best subset of bolt combinations used as a predictor for insect density at the tree level, was selected using forward stepwise regression with the standard error (SE) and the adjusted coefficient of determination (Adj. R^2) as criteria for variable selection (Table 2). The response variable had to be transformed using a Box-Cox transformation to meet the assumption of normally distributed residuals (Shapiro Wilk test $w=0.852$; p -value < 0.0001 ; $\alpha=0.05$). However, by doing so, it was necessary to linearize all models using the natural logarithm transformation to reduce nonlinearities present in the final model. Linearization was

conducted on the transformed and the predictive variables to allow for a least square fitting method (Figure 2).

The correlation between the observed and estimated within-tree insect population was determined using the Pearson coefficient (Figure 3). For this analysis, only trees with the presence of the life stages of *Sirex* woodwasp were included. Model validation was carried through cross-validation using a bootstrapping subsampling with replacement technique (Efron 1979). To achieve this, subsets of K samples were recursively taken out of the original data and used to fit the model. The size of each subset was automatically defined by the function *Nsamples* on the R environment. A K limit of 10,000 simulations was defined, which generated new estimators for β_0 and β_1 (model parameters), standard error and the adjusted R^2 . Each model that we ran was compared against non-selected values to calculate errors on predicted values (Table 3).

2.5.- Within-Tree infestation pattern as related to tree height and bark thickness.

We developed a two-stage approach to evaluate *Sirex* infestation. First, we generated a binomial regression model using infestation up to a certain threshold as the indicator variable. Each bolt was evaluated and coded as follows:

$$y_i = \begin{cases} 1, & \text{if infected} \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases}$$

Independent variables for the model were either relative height or absolute height, bark thickness, and age. Therefore, our binary response variable represented the probability of attack between the base of the tree and thresholds from 1 to 25 meters. We did not evaluate diameter as a model predictor because it showed a close correlation with bark thickness (Pearson test = 0.695; $R^2 = 0.47$). To fit the equation, we applied two common transformations used with generalized linear models: Logit and Probit. The main difference between the two relies on the link function used to transform the data. The logit transformation uses a logistic transformation ($\log(x/(1-x))$) and the probit uses the cumulative normal equation ($\Phi(x)$). Resulting equations were compared using the Akaike Information Criteria (AIC):

$$AIC = 2k - 2 \ln(\hat{L})$$

where k is the number of parameters in the model and $\ln(\hat{L})$ is the equation log-likelihood.

Smaller AIC values indicate a better fit (a more likely equation given the observed data).

Equations that had very similar in AIC values were compared using a likelihood ratio test:

$D = -2 \log \frac{L_0}{L_a}$; where L_0 corresponds to the likelihood of the base model and L_a is the

alternative model. We selected the model that best met the defined criteria.

2.6.- Wood moisture vertical distribution on infested and healthy trees.

A subsample of 27 symptomatic trees was selected in the field (9 trees per age class), together with another sample made up of 18 healthy trees (6 trees per age class). The same procedure detailed in section 2.2 was performed, except the treatment for bolt samples of 1-m length. All trees classified as symptomatic were checked for *S. noctilio* colonization. The diameter at both ends together with bark thickness was measured immediately after cutting the bolts. Subsequently, from the mid part of the bolt, a 25-mm thick disc was taken and weighed in situ using a precision balance (0.1 g) Ohaus®. Discs were placed inside hermetic labeled bags and transported to the drying chambers, where drying that reduced total wood moisture content to 12% was applied. The discs were left in an oven at $103 \pm 2^\circ$ C for 48 hours to be weighed a second time in the anhydrous state. The wood moisture of each sampled bolt was calculated using the following formula:

$$Wm(\%) = \frac{W_w - D_w}{W_w} * 100$$

where Wm is wood moisture (dry basis), Ww is wet weight, and Dw is dry weight.

A total of 691 bolts were extracted from 45 sampled trees. Regression models were used to determine how the moisture content of the wood varied over relative height for healthy and attacked trees. Finally, we evaluated the effect of age on the moisture content of *Sirex noctilio* infested trees and compared it with trees that were not attacked.

3. RESULTS

3.1.- Modeled within-tree population based on bolts subsamples taken at different heights.

The *Sirex* population size sampled from bolts taken between 40% and 80% of the relative

height was the best predictor for the within-tree larval population. The best subset obtained in our study was a sample including populations measured from five 1-m bolts taken from 40%, 50%, 60%, 70% and 80% of the relative height, respectively, with adjusted R^2 (Adj. R^2) of 81.3% and a standard error (SE) of 0.33. When the sampling rate was reduced, for example, to a subset with 3 bolts (40%, 50%, and 70% of relative height), the standard error increased only by 0.03 whereas R^2 decreased by 0.07% (Table 2).

Table 2. Subset of bolt combinations selected using stepwise regression analysis to predict within-tree population of *S. noctilio* larvae.

No. of samples	Bolt (X_i) ^a	SE	R^2	Adjusted R^2
1	X_{70}	0.53	50.37	49.99
2	X_{50}, X_{70}	0.42	69.65	69.18
3	X_{40}, X_{50}, X_{70}	0.38	74.34	73.75
4	$X_{40}, X_{50}, X_{70}, X_{80}$	0.35	78.49	77.81
5	$X_{40}, X_{50}, X_{60}, X_{70}, X_{80}$	0.33	81.39	80.66

^a Bolt X_i indicated a section of 1-meter length, extracted from the base of *ith* relative height class (where $i=10, 20, 30$ and consecutively to 90).

The resulting predictive models from the regression analysis with the best subsets of 1-m bolts taken from a certain relative height (Table 3 A and Figure 2) showed a positive correlation, with R^2 values ranging from 0.83 and 0.90 for the three best models. For the model based on five subsamples, the actual *Sirex* populations were not significantly different to those estimated by the predictive model ($t = 1.15$, $df = 260$, $\alpha = 0.05$ and $P = 0.24$), with a coefficient of determination $R^2 = 0.90$. The samples of this model represent sections of the trees that included entire bolts located between the middle third and the bottom part of the upper third. As we reduced the number of predictors to four subsets of bolts, the R^2 value decreased to 0.88 and there were no significant differences between the observed and predicted values ($t = 1.08$, $df = 260$, $\alpha = 0.05$ and $P = 0.27$). The model with three predictive variables had an R^2 of 0.83 and included only subsamples from the middle third of the tree (40%, 50% and 70% relative height). This model did not show significant differences between observed measurements and values

estimated by models ($t = 1.16$, $df = 258$, $\alpha=0.05$ and $P = 0.24$). When subsamples were reduced to only two bolts taken from 50% and 70% of the relative height, the correlation decreased to $R^2 = 0.71$ and, no significant differences could be seen between observed and estimated population sizes ($t = 1.66$, $df = 250$, $\alpha=0.05$ and $P = 0.09$). The within-tree *Sirex* population estimated from one bolt, extracted at 70% relative height, was significantly different from the observed values ($t = 2.40$ $df = 186$, $P = 0.01$) and showed a low $R^2 = 0.40$. Moreover, the Pearson's product-moment correlation between the observed within-tree specimens of *S. noctilio* and those estimated by the models (Figure 3) showed high correlation varying between 0.70 and 0.96 for the models with one bolt to 5 bolts, respectively. This indicates that as the number of predictor variables (bolts) increases, the model becomes more precise and less biased (Figure 3).

The validation of the models conducted by bootstrap method showed that these new predictive equations are almost identical in their correlation parameters (R^2) and error (MSE) when compared with the initial linear regression models (Table 3 B). This demonstrates the strong statistical significance of the predictive models to estimate the *Sirex* within-tree population.

Table 3. Predictive equations of within-tree *Sirex noctilio* population levels for the best 1st, 2nd, 3rd, 4th, and 5th sampled logs for: A) the lineal regression model and B) bootstrapping validation.

Model	Logs (n°)	Bolt (X_i) ^a	R ²	SE	Predictive equation
A: Lineal regression	1	X_{70}	0.4107	0.1661	$Y = (\text{Exp}(0.84421 + 0.12954 * \text{Ln}(X_{70})))^{3.7137}$
	2	X_{50}, X_{70}	0.7143	0.1636	$Y = (\text{Exp}(0.40911 + 0.22903 * \text{Ln}(X_{50} + X_{70})))^{3.7137}$
	3	X_{40}, X_{50}, X_{70}	0.8315	0.1308	$Y = (\text{Exp}(0.21801 + 0.25968 * \text{Ln}(X_{40} + X_{50} + X_{70})))^{3.7137}$
	4	$X_{40}, X_{50}, X_{70}, X_{80}$	0.8859	0.1076	$Y = (\text{Exp}(0.18117 + 0.25785 * \text{Ln}(X_{40} + X_{50} + X_{70} + X_{80})))^{3.7137}$
	5	$X_{40}, X_{50}, X_{60}, X_{70}, X_{80}$	0.9044	0.0984	$Y = (\text{Exp}(0.15411 + 0.24741 * \text{Ln}(X_{40} + X_{50} + X_{60} + X_{70} + X_{80})))^{3.7137}$
B: Bootstrap validation	1	X_{70}	0.4149	0.1633	$Y = (\text{Exp}(0.84362 + 0.12976 * \text{Ln}(X_{70})))^{3.7137}$
	2	X_{50}, X_{70}	0.7161	0.1610	$Y = (\text{Exp}(0.40815 + 0.22938 * \text{Ln}(X_{50} + X_{70})))^{3.7137}$
	3	X_{40}, X_{50}, X_{70}	0.8311	0.1288	$Y = (\text{Exp}(0.21888 + 0.25941 * \text{Ln}(X_{40} + X_{50} + X_{70})))^{3.7137}$
	4	$X_{40}, X_{50}, X_{70}, X_{80}$	0.8856	0.1061	$Y = (\text{Exp}(0.18193 + 0.25763 * \text{Ln}(X_{40} + X_{50} + X_{70} + X_{80})))^{3.7137}$
	5	$X_{40}, X_{50}, X_{60}, X_{70}, X_{80}$	0.9039	0.0965	$Y = (\text{Exp}(0.15392 + 0.24743 * \text{Ln}(X_{40} + X_{50} + X_{60} + X_{70} + X_{80})))^{3.7137}$

^a Bolt X_i indicated a section of 1-m length, extracted from the base of i th relative height class (where $i=10, 20, 30$ and consecutively to 90).

Figure 2. Models to estimate within-tree *Sirex noctilio* population, using different combinations of 1st, 2nd, 3rd, 4th, and 5th sampled logs. Y_x corresponds to the value of Sirex woodwasp population per tree. The independent variable X_i indicates the sum of bolts of 1-meter length, extracted from the base of i th relative height class (where $i=10, 20, 30$ and consecutively to 90 percent).

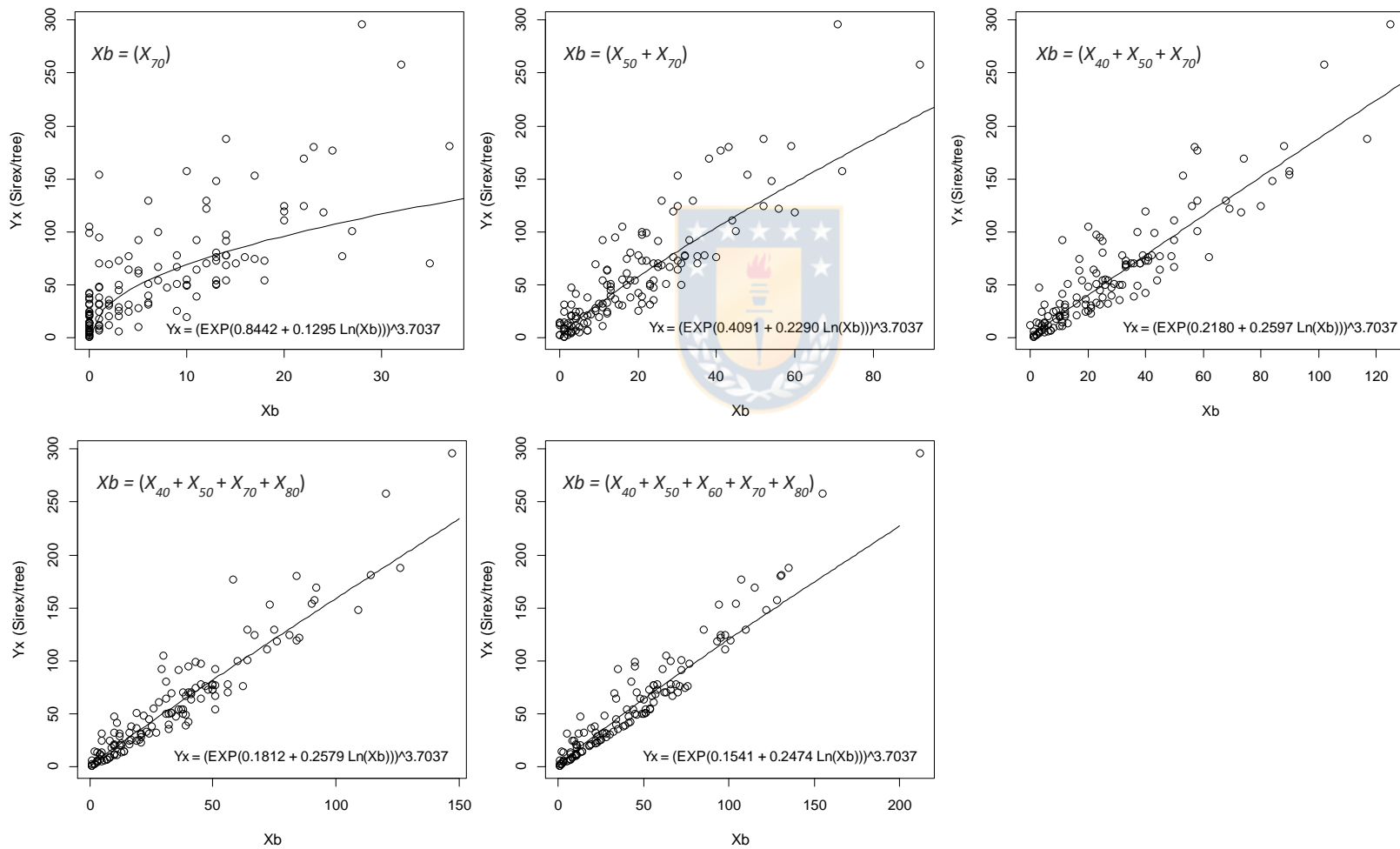
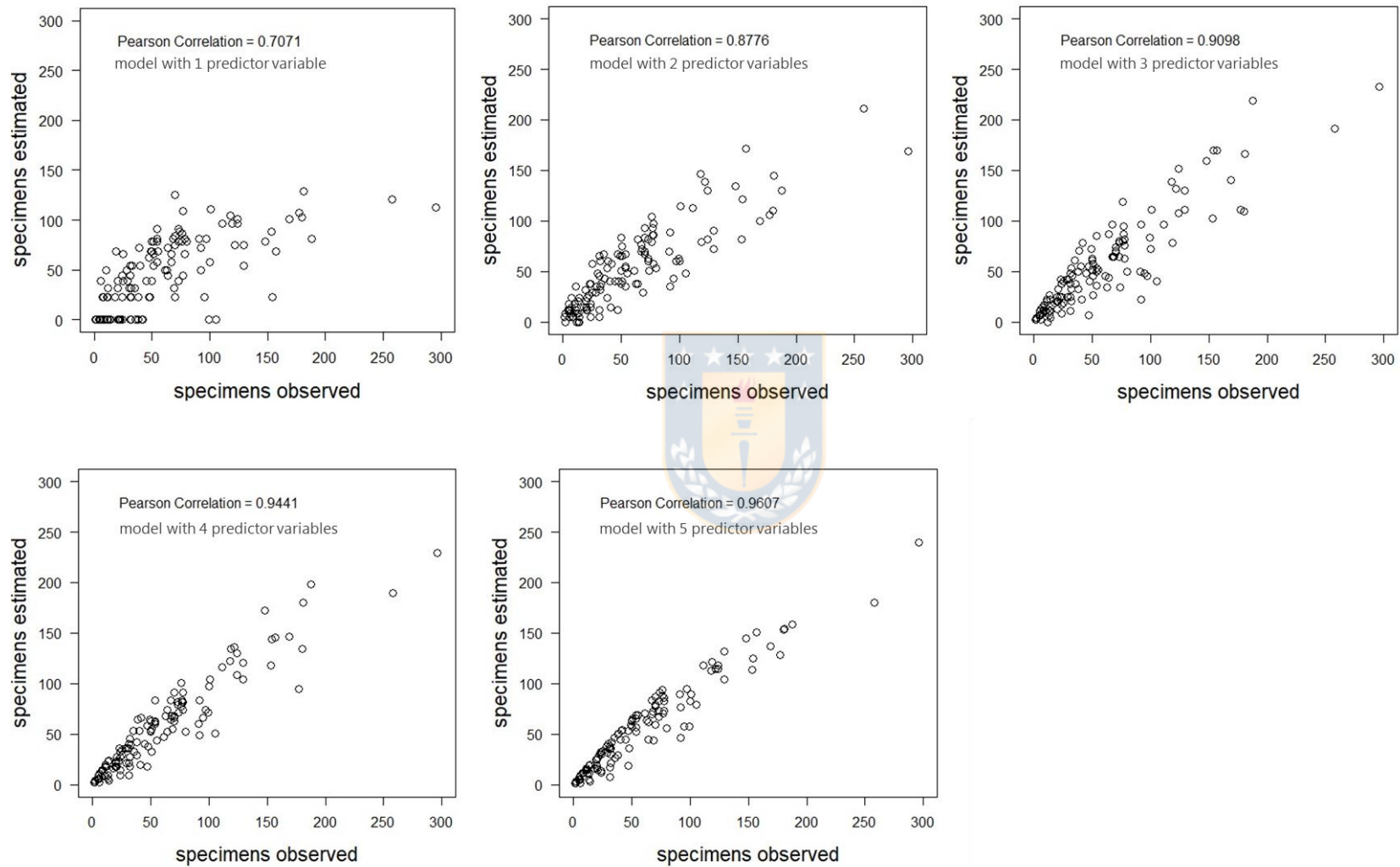


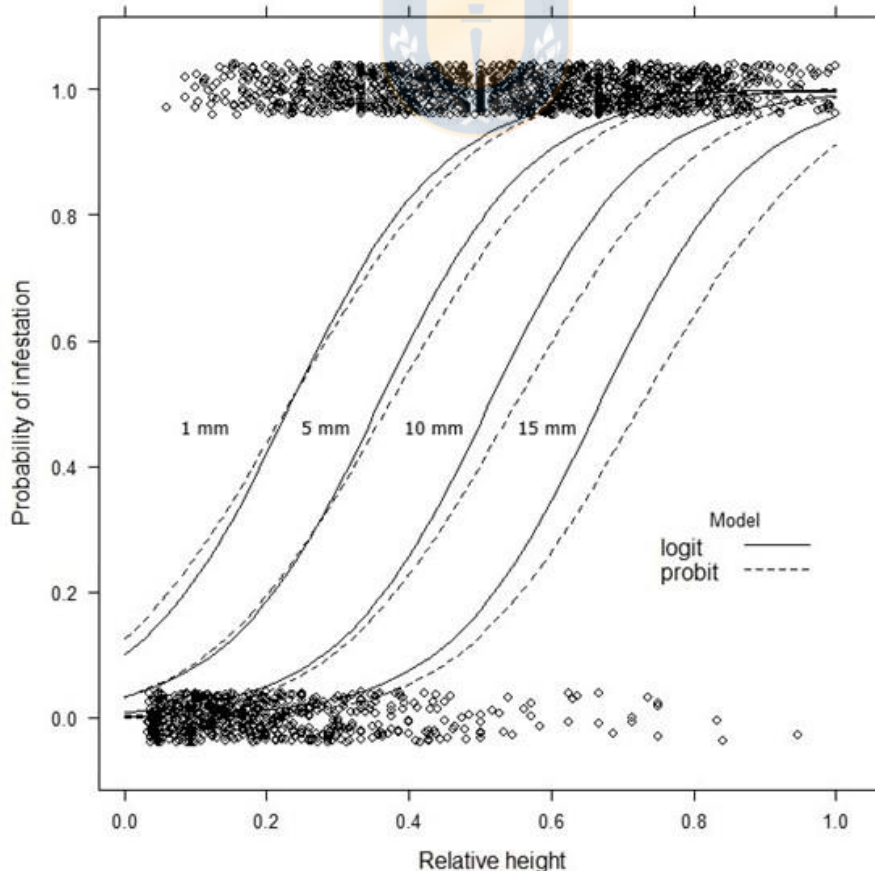
Figure 3. Pearson's product-moment correlation between the observed and the estimated *Sirex noctilio* population.



3.2.- Within-Tree infestation pattern as related to tree height and bark thickness.

The regression analysis conducted to determine the infestation probability showed a strong significant effect when using relative height as the dependent relative variable ($\Pr(>|z|) < 2e-16$ and $AIC = 1,398.1$) for both logit and probit transformations, respectively ($\Pr(>|z|) < 2e-16$ and $AIC = 1,422.5$). Bark thickness was also statistically significant with a logit transformation ($\Pr(>|z|) < 0.000$; $AIC = 1,398$) and probit transformation ($\Pr(>|z|) < 0.000$; $AIC = 1,422.5$) (Table 4). Age did not have a significant effect; therefore, it was excluded from analysis as a predictor for model 1. However, the interactions between total height, bark thickness, and age were significant ($\Pr(>|z|) < 0.000$) for both forms of model 2 (logit $AIC = 1,280.8$ and probit $AIC = 1,282.6$). The fitted models differed in their AIC values, and indicated model 2 using a logit link equation was the best candidate model (Figure 4).

Figure 4. Probability of infestation by *S. noctilio* according to logit and probit models for four different bark thickness (1, 5, 10 and 15 mm, respectively) and relative height of infested trees.



In addition, differences between logit and probit formulations of these equations disagree only in 2 units, limit value to choose the best model. This result implies that *S. noctilio* accumulates inside the tree using a normal distribution along the stem, concentrating the populations around the 50% of relative height. The model also showed that the probability of infestation increased as relative height increased and the bark thickness (BT) decreased. When we compared different bark thicknesses (BT = 1, 5, 10 and 15 mm), with their respective probabilities of *S. noctilio* infestation (logit model), regardless of age, we observed that at 40% relative height and BT = 1 mm, the probability of infestation is 82.5%. This pattern decreases gradually as the BT increases until reaching a probability of 7.5% with BT = 15 mm (Figure 4). Bark thickness effect maintains a similar trend when the selected model shows variations in tree height and age. As the probability of infestation increases with height, its magnitude varies according to age and decreases with increasing bark thickness (Figure 5).

Figure 5. Logit model of probability of infestation by *Sirex noctilio* based on age and tree height of radiata pine trees, for four different bark thicknesses (1, 5, 10 and 15 mm).

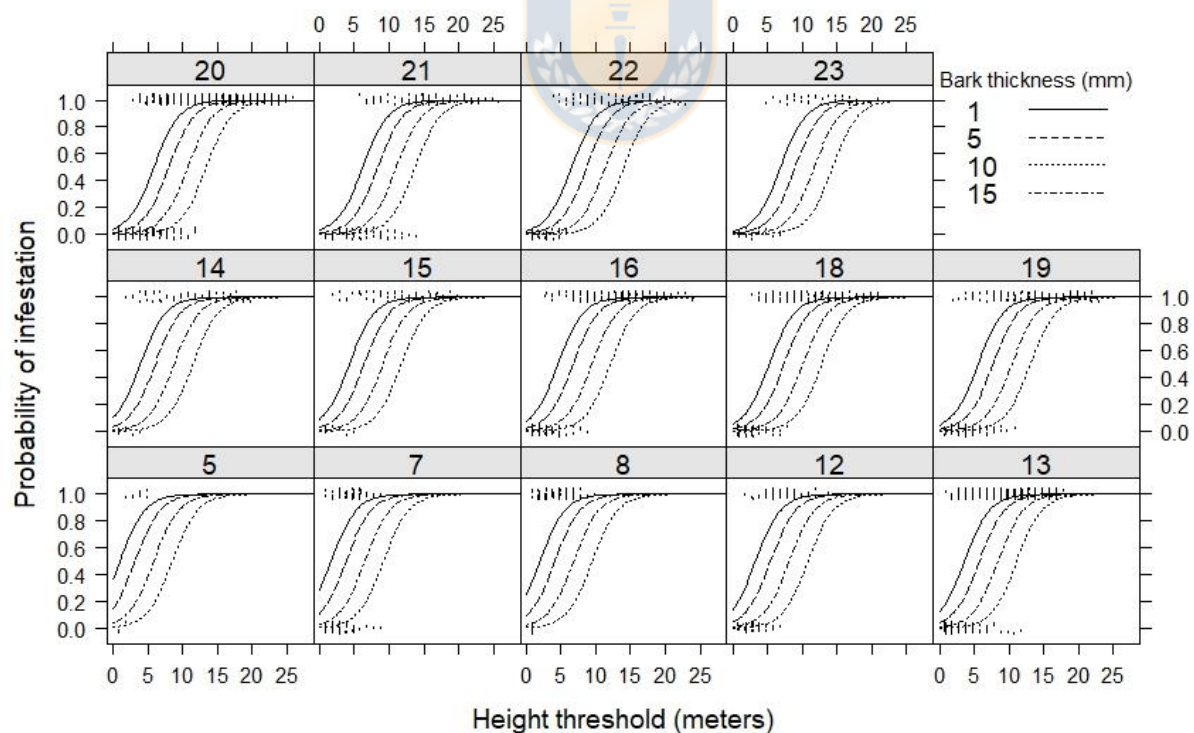


Table 4. Regression coefficients for the infestation probability model.

Equations	Model Form	Dispersion parameters ⁽¹⁾			Variables ⁽²⁾	Coefficient parameters					
		AIC	Null deviance	Residual deviance		Parameters	Estimate	Std. error	z value	Pr(> z)	Signif. Stat
Model 1: $Y = \beta_0 + \beta_1*(hi/ht) + \beta_2*Bw$	Logit	1398,1	2548,1 (2096)	1392,1 (2094)	Intercept	β_0	-1,906	0,265	-7,18	0,000	***
					Relative height (<i>hi/ht</i>)	β_1	9,377	0,530	17,68	< 2e-16	***
					Bark Width (<i>Bw</i>)	β_2	-0,290	0,076	-3,78	0,000	***
	Probit	1422,5	2548,1 (2096)	1416,5 (2094)	Intercept	β_0	-0,976	0,145	-6,69	0,000	***
					Relative height (<i>hi/ht</i>)	β_1	4,959	0,267	18,54	< 2e-16	***
					Bark Width (<i>Bw</i>)	β_2	-0,175	0,041	-4,20	0,000	***
Model 2: $Y = \beta_0 + \beta_1*ht + \beta_2*Bw + \beta_3*Ag$	Logit	1280,8	2548,1 (2096)	1272,8 (2093)	Intercept	β_0	0,630	0,265	2,37	0,018	*
					Height total (<i>ht</i>)	β_1	0,549	0,031	17,62	< 2e-16	***
					Bark Width (<i>Bw</i>)	β_2	-0,295	0,082	-3,60	0,000	***
	Probit	1282,6	2548,1 (2096)	1274,6 (2093)	Age (<i>Ag</i>)	β_3	-0,178	0,018	-9,92	< 2e-16	***
					Intercept	β_0	0,368	0,152	2,41	0,016	*
					Height total (<i>ht</i>)	β_1	0,308	0,016	18,75	< 2e-16	***
Bark Width (<i>Bw</i>)	β_2	-0,167	0,045	-3,69	0,000	***					
Age (<i>Ag</i>)	β_3	-0,101	0,010	-10,11	< 2e-16	***					

Signif. Codes: 0 '***' - 0.001 '**' - 0.01 '*'

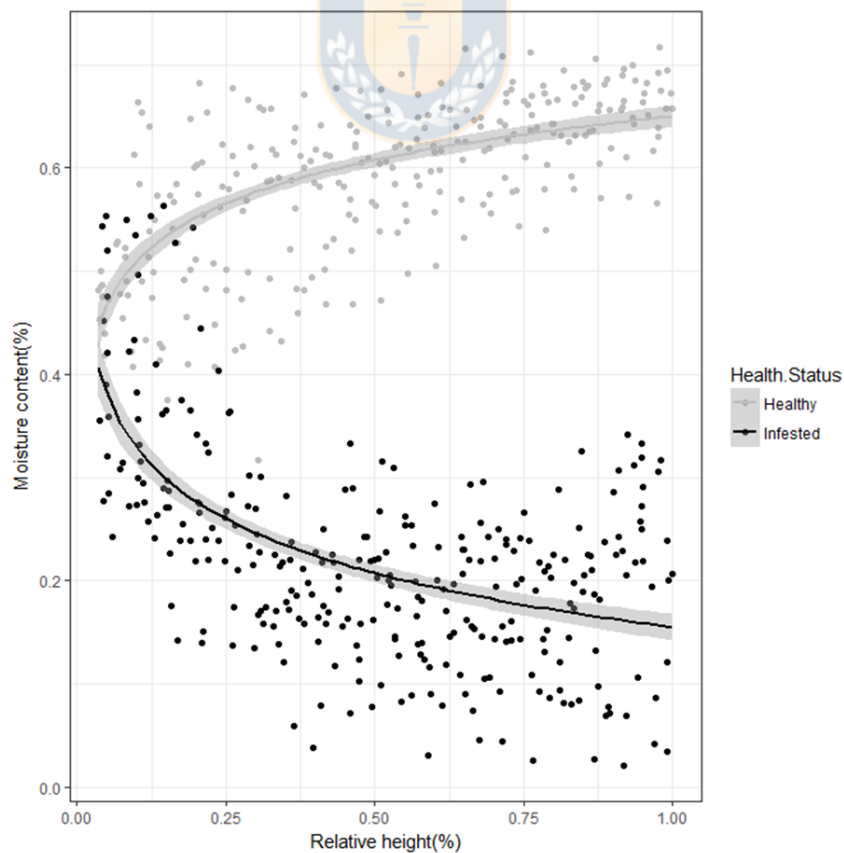
⁽¹⁾ Values between parenthesis, corresponding to degrees of freedom

⁽²⁾ *hi/ht*: Proportion between height of bolts to *i* meters (*hi*), respect to the total height of tree (*ht*)

3.3.- Wood moisture vertical distribution on infested and healthy trees

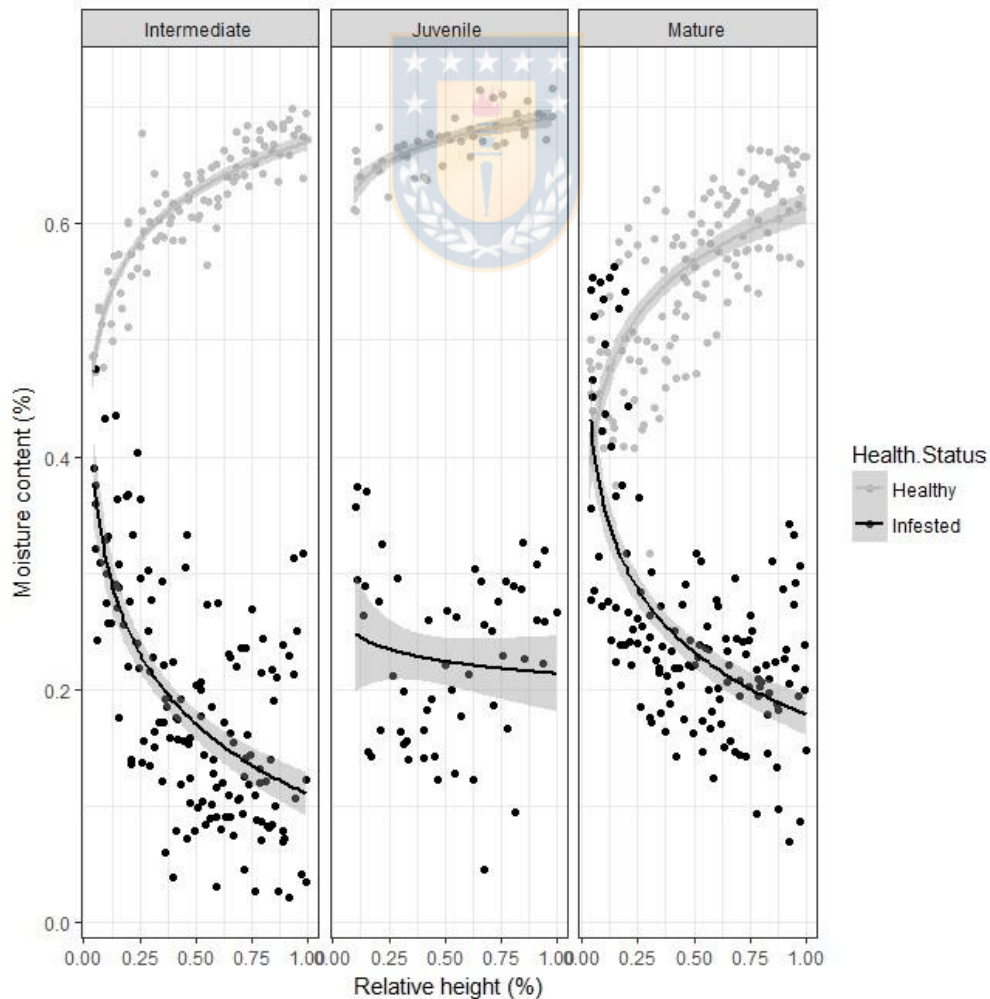
Our results show lower moisture content along the vertical profile on attacked trees, which clearly differs from the patterns found on healthy trees. Both healthy and infested trees follow a logarithmic model $Y_i = a + b * \text{Ln}(X_i)$ that relates moisture content (Y_i) with relative height (X_i), showing completely opposite trends (Figure 6). We found a decreasing amount of moisture content on attacked trees with increasing height, following the equation $Y_i = 0.1552 + -0.0755 * \text{Ln}(X_i)$ (df = 396, $R^2 = 0.33$). A high percentage of infested bolts had around 40% moisture content as an upper threshold. On healthy trees, the moisture content increased with height from that threshold value and the model corresponds to $Y_i = 0.6503 + 6.0305 * \text{Ln}(X_i)$ (df = 301, $R^2 = 0.39$).

Figure 6. Wood moisture variation respect to relative height, for radiata pine trees healthy and infested by *Sirex noctilio*; gray bands correspond to confidence intervals of the mean.



The same logarithmic trend was observed independent of plantation age (Figure 7) with R^2 values proportional to the magnitude of infestation and tree age. Better coefficients of determination were observed for healthy trees on mature ($R^2 = 0.53$) and intermediate ages ($R^2 = 0.80$) respectively. Juvenile trees showed the lowest values ($R^2 = 0.21$). The highest values of moisture content (up to 60%) were observed on healthy trees at a juvenile age. These values were expected because the woody tissue is composed mainly of water (Cown and McConchie 1982), and trees over 12 years old (intermediate and mature ages) increase the proportion of heartwood cells. Consequently, as cells get closer to the woody cylinder, moisture content decreases to values close to 40%.

Figure 7. Wood moisture and relative height, for different age classes of healthy and *Sirex* infested radiata pine.



4. DISCUSSION

This research is the first attempt to estimate within-tree *S. noctilio* populations in radiata pine plantations in Chile. The model developed relies on a binary infestation variable defined by 1-m bolts extracted between 40 and 80% from the relative stem height, as predictor variables (Table 3 A, Figure 2). These results are in contrast with other published models that used absolute height locations within the stem, limited to a fixed height. For instance, the model developed by Eager (2011) estimated *Sirex* woodwasp populations in the whole tree for *P. resinosa* and *P. Sylvestris* utilizing six combinations of up to five 0.5 m logs, extracted up to an 8.5 m threshold height. Other wood eating insects like *Agrilus planniplenis*, a severe pest on *Fraxinus* spp., were described using a predictive model with up to four 1-m logs extracted from the base of each tree up to eight meters in height on infested trees (Foelker *et al.* 2013). Our model does not have a maximum height threshold or an age limit because it relies on a relative position instead of an absolute. The main advantage is that this approach allows for the possibility to predict infestation levels for any height limit and age. This enable operational scaling for monitoring programs of *S. noctilio* on *P. radiata* plantations, which are normally characterized by sudden changes in age structure between neighboring stands (Mead 2013).

The most accurate estimation of whole-tree *Sirex* larval densities resulted from extracting up to five 1-m logs located within 40% to 80% of the total height. However, when using a subset of three bolt samples from 40%, 50% and 70% of the total height, we were able to calculate reasonably precise within-tree *Sirex* population estimates ($R^2=0.83$), even using only two samples extracted from 50% and 70% of total height ($R^2=0.71$). These results imply a more appropriate sampling method for an operational scale, with an adequate balance between statistical accuracy and sampling cost leading to a cost-effective method to quantify the insect populations, as suggested by other authors (Fierke *et al.* 2005; Crook *et al.* 2007; Foelker *et al.* 2013).

Our model showed that probability of finding life stages of *Sirex noctilio* in *P. radiata* was significantly affected by bark thickness, age and absolute tree height (Figure 5). We hypothesize that the bark thickness acts as a physical barrier to female ovipositor penetration. Accordingly, *Sirex* woodwasps would have severe constraints in colonizing tree sections with bark thickness greater than 10 mm, normally located on the lower portions of mature trees. Our

results are consistent with results published by Penteadó (2002) in *P. taeda* and Eager (2011) in *P. sylvestris* and *P. resinosa*. These authors also suggested bark thickness to be a physical barrier to successful wasp colonization. Nonetheless, in those studies, no significant effect on *S. noctilio* was shown that resulted from within-tree density variations. Conversely, our findings are consistent with a study in *Pinus densiflora* attacked by *Sirex nitobei* (Fukuda *et al.* 1993), which showed a negative correlation between bark thickness and the number of deposited eggs on the stem by *Sirex* females.

Both models developed by our research, one estimating the *Sirex* whole-tree population through subsets of bolts and the other estimating the probability of infestation (Table 4), showed indirectly that the middle third of the stem concentrates the highest population density of *Sirex* woodwasp in *P. radiata*. The vertical distribution pattern shown in our research is consistent with other studies made on *P. radiata* trees in Australia (Neumann *et al.* 1982) and New Zealand (Morgan and Stewart 1966). Also, our research is consistent with studies made on pine species such as *P. sylvestris* in North America (Eager *et al.* 2011; Ryan 2011), *P. taeda* in Brazil (Penteadó *et al.* 2000) and *P. sylvestris* in Canada (Ryan *et al.* 2013). Our data on the spatial distribution of oviposition and resinosis, deduced from infestation model, were similar with the results reported by Ryan *et al.* (2013).

Within-tree distribution of *Sirex* seems to be regulated by both bark thickness and wood moisture content. Bark thickness is a physical barrier preventing oviposition by females, and the moisture of wood acts as a physiological barrier that reduces successful colonization by *S. noctilio*. In our study, the majority of infested bolts by *Sirex* larvae contained less than 40% moisture on a dry basis. This range is appropriate for adequate development of larval stages to occur (Madden 1981). In turn, these larvae depend on the successful establishment of the symbiotic fungi *Amylostereum areolatum*. The fungi grow quickly in dry wood (Coutss and Dolezal 1965), and this increases the survival and nutrition of *Sirex* larval populations (Slippers *et al.* 2015). However, if moisture content were reduced below the 20% threshold, eggs and juvenile larvae would die from dehydration, while adult larvae could continue their development at a slower, limited rate.

On the other hand, if wood moisture content were increased above the 40% threshold, larval survival would decrease drastically, due to the loss or slow development of the symbiotic

fungi. Consequently, there are sections of the tree that show a higher frequency of oviposition. This is because this area has suitable humidity content and offers a lower resistance to the penetration of the oviscapte, which was demonstrated by Ryan *et al.* (2013) through the observation of resinosis in the trunk. Thus, those areas that concentrate ovipositions, together with increased physiological stress caused by the phytotoxic mucus, should increase the probability of infection by the symbiont fungus *A. areolatum*. Upon successful establishment of fungi, a food source is provided to *Sirex* larvae, which increases their survival and population growth. However, it must be noted that other factors of resistance to oviposition (e.g., resin pressure of trees) sometimes act antagonistically to the physical barrier constituted by bark thickness. In spite of that, *P. ponderosa* (for example) produces more resin than *P. contorta*, acting as a chemical barrier to oviposition; however simultaneously, the thinner bark of *P. ponderosa* could favor the colonization of *Sirex* in this species (Lantschner *et al.* 2013).

In conclusion, our research work can help improve the population estimates of *S. noctilio* on infested radiata pine plantations, providing a rapid and statistically reliable sampling procedure. Furthermore, sampling could be focused only on infested logs, using the measured moisture content as an indicator. These estimates can be made with a hygrometer that is calibrated with moisture content on a dry basis (Hurley *et al.* 2008). Future research should adjust the model to estimate the whole tree population, considering the existing relationships between the probability of infestation, bark thickness, moisture content and within-tree population of *S. noctilio*.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Mr. Mario Oliva and Mr. Rolando Gómez from Forestal Arauco for their valuable support throughout this research. We also wish to thank Mr. Eduardo Rodríguez, General Manager of Bioforest S.A. for his support and especially Dr. Rodrigo Ahumada, the Phytosanitary Protection Manager of Bioforest S.A., for his technical support and guidance. We are thankful to Mr. Rodrigo Saavedra and Sandra Fuenzalida for their help with GIS and statistical analyses, respectively, and to Mr. Ignacio Diaz for useful comments and observations of this manuscript.

4. INOCULACIONES INUNDATIVAS DE DELADENUS SIRICIDICOLA COMO METODO PARA AUMENTAR EL PARASITISMO DE SIREX NOCTILIO EN CHILE

M.A Poisson, Carolina Valiente, E Sanfuentes

Artículo en preparación

RESUMEN

En dos predios ubicados en la región del Biobío, con plantaciones de *P. radiata* de 17 y 20 años y con poblaciones de *S. noctilio* recientemente establecidas en la región del Biobío, se efectuó un estudio de inoculaciones artificiales del nematodo *Deladenus siricidicola*, sobre rodales que presentaron niveles de parasitismo menores al 20% después de un año de inicio del control biológico. El objetivo fue determinar el nivel de parasitismo por *Deladenus*, en función de la cantidad de nematodos inoculados en arboles infestados, variando la dosis y espaciamientos en la inoculación. Se inoculó una cantidad de nematodos en dosis que fluctuaron entre 121 mil a 2,9 millones de nematodos por árbol, mientras que al variar los espaciamientos de inoculación, se inoculó entre 242 mil a 970 mil nematodos por árbol. Con el primer método, la concentración de nematodos equivalente a seis veces respecto al estándar (6X), alcanzó 89,4% de parasitismo en el predio La Dicha, comparado con 30,7% de parasitismo en árboles no inoculados. En el predio El Quillay, los tratamientos seis o tres veces mayor al estándar obtuvieron parasitismos que no difirieron entre ambos, de 79,9% y 75%, respectivamente. Al aumentar los puntos de inoculación por árbol, el incremento en cuatro veces de la dosis de nematodos por árbol (4X), obtuvo 74,3% de parasitismo en el sitio La Dicha, siendo mayor al tratamiento estándar (1X), que presentó 47,6% de parasitismo y al 34,4% del parasitismo natural. Se concluye utilizar inoculaciones aumentando seis veces la dosis de nematodos (6X), por sobre la de aumentar la densidad de perforaciones, que implica mayores costos y dificultades en operaciones masivas de control biológico.

Palabras claves: Control biológico aumentativo, Inoculaciones *Deladenus siricidicola*, Parasitismo *Sirex noctilio*

1.- INTRODUCCION

El uso del nematodo parasítico *Deladenus siricidicola* Bedding es reconocido como la principal herramienta de control biológico de la avispa de la madera *Sirex noctilio* (Fabricius) en plantaciones atacadas (Slippers *et al.* 2012). El insecto fue introducido accidentalmente a la zona sur de Chile el año 2001, detectándose en dos localidades de las regiones de Los Ríos y Los Lagos a partir de las cuales comenzó su dispersión infestando plantaciones de *Pinus radiata* D. Don localizadas hacia la zona norte. La acelerada dispersión de la plaga, facilitada por plantaciones continuas, y una mayor susceptibilidad de las plantaciones en los sitios colonizados, obligaron a reforzar e incrementar las medidas de supresión y control de la plaga por la autoridad sanitaria (SAG 2010). El plan oficial de control focalizó sus acciones en la erradicación de nuevos focos hasta el año 2006. Sin embargo, a partir de ese año se modifica la estrategia hacia una de supresión, incorporando el uso del control biológico con el nematodo *D. siricidicola*, principal agente de control biológico de *S. noctilio* en el hemisferio sur (Beéche *et al.* 2012).

Los resultados de su aplicación mostraron tasas de parasitismo que fluctuaron entre 13,6% el 2007 hasta 44% el 2009, no observándose en las regiones bajo control biológico (Araucanía, Los Ríos y Los Lagos), niveles importantes de infestación o mortalidad de las plantaciones atacadas por *S. noctilio*, probablemente debido al bajo nivel de estrés hídrico existente en esas zonas (Huber and Trecaman 2004). Sin embargo, las poblaciones de Sirex que ingresaron a la región de Biobío durante el 2009, causaron niveles de ataque sobre 60% en algunos rodales (Beéche 2012), con mayores niveles poblacionales del insecto y una tasa de dispersión más elevada que la observada en la zona sur. Castillo (2018), reportó que Sirex desde una superficie invadida de 200 ha el año 2010, se incrementó a 3100 ha y luego a 5800 ha en los años 2012 y 2013 respectivamente, en plantaciones de la región del Biobío.

La introducción y liberación del nematodo *D. siricidicola* se efectúa siguiendo un protocolo de inoculación estandarizado, que incluye preparación de las dosis, transporte, almacenamiento e inoculación de los árboles en terreno (SAG 2009). Algunas fases del proceso son críticas para un establecimiento exitoso del nematodo; por ejemplo, el medio para inocular los nematodos, basado en el uso de una solución en base a gelatina al 12% (Bedding and Akhurst

1974) o un gel de poliacrilamida con partículas < 600 u. (Bedding 2009). También la densidad de nematodos inoculados en el árbol y el contenido de humedad de la madera, que podrían restringir el crecimiento del hongo simbiote *Amylostereum areolatum* (Chaillet) Boiden, del cual se alimentan los nematodos en su fase micetófaga (Ryan and Hurley 2012). La técnica de inoculación es otro factor que tiene gran importancia, especialmente el proceso de efectuar los orificios de inoculación con el martillo, efectuado con un martillo saca-tarugos, que debe proveer un corte limpio, sin astillas que obstruyan el ingreso de los nematodos a través de las traqueidas (Bedding 2009).

El inicio de las inoculaciones en la región de Biobío, fue con dosis de nematodos formuladas con gel de poliacrilamida y una suspensión concentrada de nematodos (20 ml), que contenía entre 1 y 2 millones de ejemplares. Las dosis se inocularon en puntos u orificios de inoculación con un volumen de 1,1 a 1,2 ml de gel, conteniendo una densidad promedio de 1000 a 2000 nematodos por orificio. La inoculación de trozas infestadas en los predios atacados se efectuó según protocolo desarrollado en Forestal Arauco, que fue utilizado desde el año 2007 para el control biológico de Sirex en plantaciones de *P. radiata* en la zona sur. Este protocolo difiere del aplicado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG 2009), en el número de hileras con perforaciones que van paralelas al eje del árbol, las que se localizan espaciadas cada 30 cm sobre tres hileras ubicadas en un plano axial a los 0°, 45° y 315° siguiendo el eje del tronco (con diámetro mayor a 15 cm), mientras que el de SAG es con dos hileras a los 45° y 315°, respectivamente. Los resultados obtenidos en inoculaciones operacionales mostraron incrementos de hasta 5 puntos porcentuales (datos del autor, no publicados), respecto al procedimiento de inoculación recomendado por Bedding and Akhurst (1974). Otra vía utilizada para aumentar la densidad de nematodos inoculados es disminuyendo la distancia del espaciamiento entre perforaciones, variando de 20 a 25 cm para el control de poblaciones epidémicas de *S. noctilio* en Australia ((Neumann and Minko 1981; Haugen and Underdown 1990).

Sin embargo, un aumento significativo en la cantidad de nematodos inoculados podría introducir competencia a las larvas de Sirex por el mismo sustrato alimenticio, que es el micelio del hongo *A. areolatum* (Madden 1974, Bedding 1979, 1984). Como consecuencia, habría emergencias de hembras de Sirex de menor tamaño, las que tienen menos capacidad de vuelo y

producen menos huevos parasitados (Villacide and Corley 2008), reduciéndose el potencial de dispersión del nematodo. Esto fue parcialmente observado por Bedding and Hakhurst (1974), quienes al efectuar inoculaciones con un espaciamiento de sólo 10 cm. obtuvieron menos hembras y de menor tamaño, que las emergidas desde trozos no inoculados. Por otra parte, se ha observado que especímenes de *Sirex* severamente infectados por el nematodo, mueren tempranamente en su estado inmaduro sin alcanzar a llegar al estado adulto (Zondag 1969). Este hecho podría afectar eventuales inoculaciones artificiales inundativas, porque a pesar de obtenerse altos niveles de infección, la elevada mortalidad subyacente de larvas de *Sirex* parasitadas traería como consecuencia, un aumento en la sobrevivencia de los nematodos menos virulentos, reduciéndose de esta forma el nivel de parasitismo a futuro (Slippers 2012). Variaciones en el espaciamiento y la densidad de inoculación fueron ensayados en 1971 sobre *P. radiata* infestado por *Sirex* en Tasmania (Bedding and Arkhurst 1974), obteniéndose niveles de parasitismo mayores a 90%, excepto con la inoculación de 1000 nematodos por metro de troza. Se recomendó para diámetros menores a 15 cm. inyectar 2000 nematodos por inoculación espaciados cada 30 cm en una hilera a lo largo de la troza infestada, quedando como tratamiento estándar a partir de entonces. Sin embargo, variaciones en la especie de pino, clima, razas del nematodo o aislamientos del hongo, podrían requerir inoculación de más nematodos para obtener los mismos resultados en menos tiempo, pero ello requeriría mayor investigación (Bedding 2009).

El objetivo del presente estudio será determinar el nivel de parasitismo por *D. siricidicola*, sobre poblaciones de *S. noctilio* establecidas recientemente en plantaciones de *P. radiata* localizadas en la región del Biobío, en función de la cantidad de nematodos inoculados sobre árboles infestados, variando las dosis y espaciamentos en la inoculación.

2.- METODOLOGIA

2.1.- Sitios de estudio

Este estudio fue realizado durante el año 2012 en dos predios ubicados en la comuna de Quilleco denominados El Quillay (37°39'45.86"O; 71°44'43.51"O) y La Dicha (37°36'25.02"S; 71°52'1.81"O), en la región del Biobío y pertenecientes a la empresa Forestal Arauco. Los

predios poseían superficies de 176,4 y 224,8 ha plantadas con *P. radiata* de 17 y 20 años, con índice de sitio 29,9 m y 32,3 m, densidad de 876 y 503 árboles/ha y alturas de poda de 2,5 y 5,2 m, respectivamente. La zona de estudio presenta un clima frío a templado, con fuerte amplitud térmica diaria (-5° y 37° C) y con presencia de una mezcla de vegetación nativa, cultivos agrícolas y plantaciones forestales (Aguayo *et al.* 2009). Las temperaturas promedio máxima y mínima mensual alcanzaron los $20,4^{\circ}$ y $7,6^{\circ}$ C, respectivamente, mientras que la pluviometría anual del año llegó a 1165 mm de precipitación (Figura 1). Los criterios de selección de los predios fueron que tuviesen rodales adultos de *P. radiata* infestados por *S. noctilio*, con resultados contrastantes en los niveles de parasitismo por *D. siricidicola* e inferiores a 20%.

Estos predios fueron colonizados por *S. noctilio* el año 2010 (SAG, 2010) y después de un fallido intento de supresión y erradicación, se inició un programa de control biológico con *D. siricidicola* el año 2011. Los resultados obtenidos al año siguiente (2012) mostraron niveles de parasitismo en hembras de *S. noctilio* de 15,1% para el predio El Quillay y de 11,4% en La Dicha.

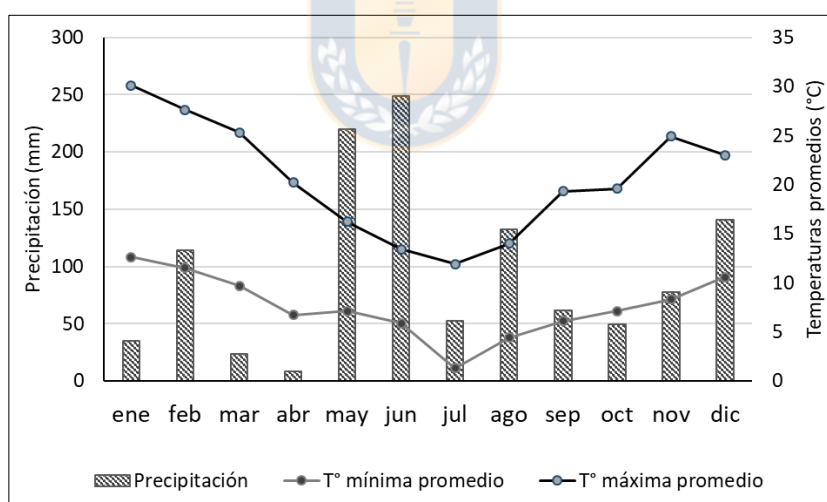


Figura 1. Información climática (pp y T°) del área de estudio, extraídos de la estación Quilaco (DGA), ubicada al SE de los sitios de estudio (14 y 22 km), para el período enero a diciembre 2012.

2.2.- Selección árboles del ensayo

Durante mayo del 2012, se seleccionaron árboles sintomáticos al ataque de *S. noctilio* que cumplieren las siguientes condiciones; i) tener un diámetro (DAP) mayor a 15 cm y que no

difierieran en más de cinco cm para cada sitio. En estos árboles se verificó que presentaran oviposturas con resinación en el fuste, en al menos una sección del tronco de 10 m de longitud (Fig. 2 B y C), que tuviesen clorosis o decaimiento foliar (Fig. 2 A) y manifestaran presencia de signos atribuibles al hongo *A. areolatum* (Fig. 2 D).

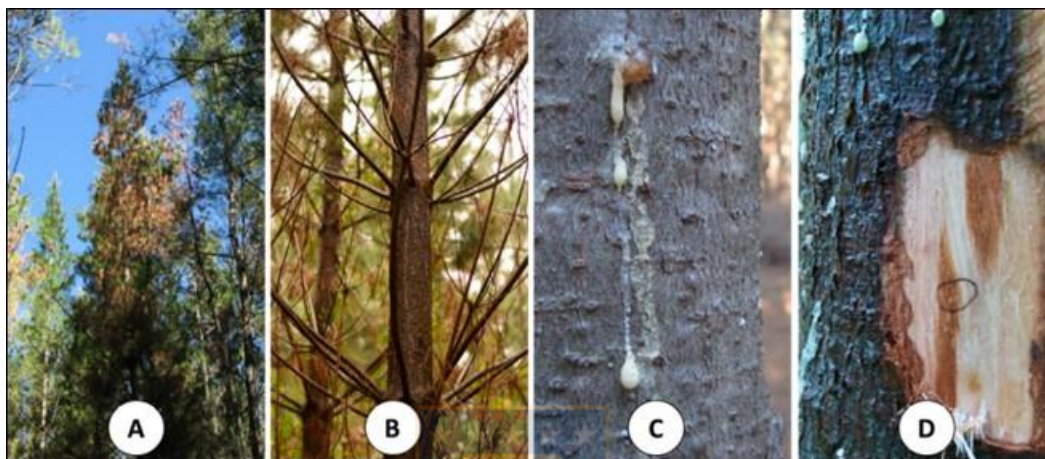


Figura 2. **A:** Clorosis y necrosis en árbol atacado por *Sirex*. **B y C:** Resinación y oviposturas de *S. noctilio* presentes en el fuste de árbol infestado por *S. noctilio*. **D:** Mancha en la madera (color café) atribuible al hongo *Amylostereum areolatum* alrededor de una ovipostura de *Sirex*.

Los árboles seleccionados se cortaron uno a uno, desramándose y midiendo su altura total hasta un diámetro límite de utilización (DLU) de 5 cm. y se revisó, que estuviesen colonizados o infestados. Para ello al 50% de la altura relativa de cada tronco, se cortó y disectó una rodela de 5 cm de espesor para observar la presencia de signos de infestación por *Sirex*; estados larvarios o galerías circulares rellenas con aserrín. De resultar negativo, se continuó extrayendo rodelas del mismo espesor hasta completar un máximo de 50 cm por cada lado del tronco, descartándose ese árbol de no haber detección positiva. Si se detectaba infestación, se repitió el mismo proceso en la sección inferior del árbol, correspondiente al 10% de la altura relativa y en la sección superior, o donde se observasen las últimas oviposturas en altura. Este procedimiento se repitió con todos los árboles preseleccionados hasta completar el número requerido de muestras, sujeto a la condición que desde cada árbol se pudiesen extraer cinco trozas infestadas de dos metros de longitud. Cada una de las trozas seleccionadas se etiquetaron

con la información del número de árbol y fueron selladas en los extremos con parafina sólida para evitar su deshidratación, hasta cuando fuesen inoculadas con nematodos según los tratamientos del ensayo.

2.3.- Preparación de dosis de nematodos en laboratorio y envío a terreno

Las dosis de nematodos fueron producidas en el laboratorio de la empresa Bioforest, a partir de aislamientos obtenidos desde sitios con alto nivel de parasitismo (mayor a 80%) ubicados en la comuna de la Unión y mantenidos en crio-preservación. El sistema de producción de nematodos (Fig. 3) fue adaptado del descrito por Bedding and Arckhust (1974) y resumidamente, consiste en la siguiente secuencia:

- (1) En placas Petri con medio de cultivo PDA se inocula micelio del hongo *Amylostereum areolatum* al cual se agrega cepa del nematodo *Deladenus* y se deja durante 21 días en crecimiento;
- (2) En matraces de vidrio de 500 ml se colocan 100 g de trigo esterilizado con 130 ml de agua destilada y se inocula con hongo y nematodo extraído de las placas colocadas en crecimiento (trozo de PDA);
- (3) Estos matraces se mantienen en condición de oscuridad a 23° C durante 45 a 60 días;
- (4) Se seleccionan los matraces con mayor cantidad de nematodos (caracterizados por tener un color ennegrecido), procediéndose a adicionar agua destilada hasta cubrir la superficie del trigo (350 ml aproximadamente);
- (5) Se agitan durante 5 o 7 minutos con un Shaker® orbital con el objetivo de soltar los nematodos adheridos al sustrato, y se extrae una solución que se deja decantar durante al menos 12 horas para luego proceder con la extracción del concentrado de nematodos a través de un filtro;
- (6) Se diluye esta solución concentrada con agua destilada hasta llegar a una dosis de 60.000 nematodos viables por ml.;
- (7) Se colocan 20 ml de solución concentrada en bolsas plásticas especialmente acondicionadas (sachet), que teóricamente contiene un millón doscientos mil nematodos. Estos sachet se

preparan el día anterior a su inoculación, manteniéndose en frío hasta su traslado a terreno en un Ice pack con hielo seco, a una temperatura que varía entre 4 - 6 C°.

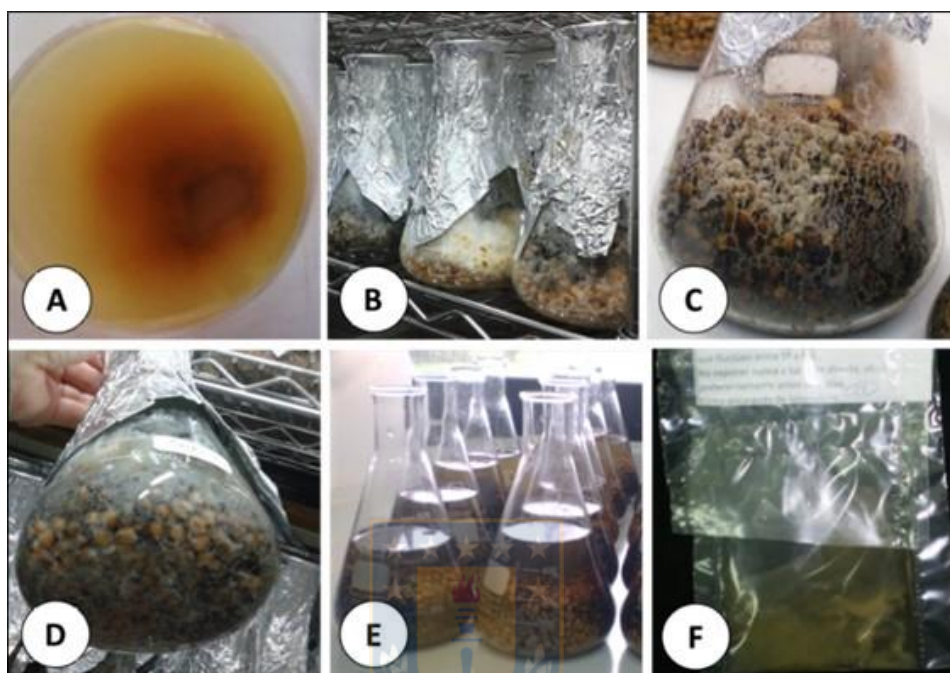


Figura 3. **A:** Inoculación de micelio del hongo *Amylostereum areolatum* en medio de cultivo PDA. **B:** Matraces con trigo inoculado con hongo y nematodo, guardados en oscuridad. **C y D:** Matraces con producción apta de nematodos, caracterizados por coloración ennegrecida del sustrato. **E:** Matraces seleccionados con adición de agua destilada para ser agitados con Shaker orbital. **F:** Dosis de 20 ml de nematodos ajustada a 1,2 millones de especímenes

2.4.- Ensayos experimentales

2.4.1.- Experimento I: Inoculación inundativa de nematodos utilizando diferentes concentraciones de dosis

Este experimento consistió en inocular a las trozas previamente extraídas de los árboles seleccionados, dosis formuladas con distintas concentraciones de nematodos. El diseño fue al azar con cinco tratamientos de inoculación y cuatro repeticiones de cada uno. Las repeticiones consistieron en cámaras de crianza donde se colocaron 4 trozas de 1 metro cada una,

provenientes de los ocho árboles seleccionados. En consecuencia, para cada repetición de un tratamiento (cámara) se necesitaron dos árboles inoculados, resultando un total de ocho árboles inoculados en el ensayo. Los tratamientos que se aplicaron en este ensayo fueron los siguientes; (1) control: 1 dosis de gel sin nematodo, (2) 0,5X: media dosis nematodos, (3) 3X: tres dosis nematodos, (4) 6X: seis dosis nematodos y (5) 12X: doce dosis nematodos, donde X representa una dosis de 1,1 millón de nematodos viables.

Para reducir la variabilidad existente en el nivel de parasitismo de *Sirex* entre distintos árboles, todos los tratamientos se aplicaron a cada uno de los ocho árboles seleccionados. La selección y asignación de los tratamientos se efectuó según el diagrama y tabla adjunta de la Fig. 4. Las cinco trozas de dos metros cada una, se marcaron a partir de la mitad del árbol en dos secciones de 2 metros hacia la parte inferior y tres secciones hacia la inferior de igual longitud.

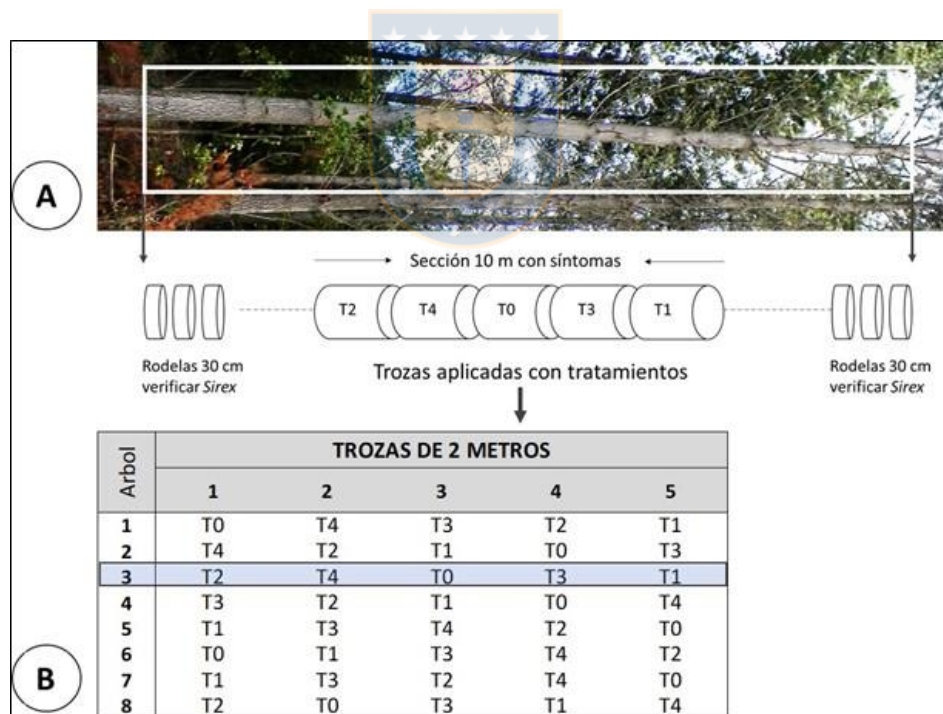


Figura 4. A: Esquema de trozado del árbol infestado N°3 del ensayo, con una sección central de al menos 10 metros con signos y síntomas asociados a *Sirex*. **B:** Cuadro con asignación aleatorizada de los tratamientos para cada uno de los árboles seleccionados.

Todas las trozas del ensayo se identificaron con etiquetas metálicas, donde se registró el número del árbol y tratamiento respectivo. Posteriormente se seccionó cada árbol en trozos de dos metros de longitud y se procedió a sellar sus extremos con parafina sólida para evitar su deshidratación. La inoculación de los tratamientos con nematodos, se realizó siguiendo un procedimiento adaptado del descrito por Bedding and Iede (2005) y utilizado operacionalmente por Forestal Arauco. Este protocolo para árboles mayores a 15 cm DAP, consiste en efectuar orificios (utilizando un martillo saca-tarugos) de aproximadamente 10 mm de profundidad y distanciados 30 cm entre ellos, siguiendo tres líneas imaginarias a lo largo de la troza que conforman un triángulo en el plano radial al unir tres orificios consecutivos (Fig. 5 A). Con este procedimiento, el número de perforaciones efectuadas en las trozas de dos metros de longitud de cada tratamiento alcanzó a 21 orificios, que recibieron un volumen total de 22,5 ml de solución en promedio. La preparación de las dosis para todos los tratamientos se muestra en la Tabla 1, incluyendo el número de especímenes inoculados por orificio y por troza. En el tratamiento control se inoculó sólo una solución de gel, sin nematodos. Las dosis preparadas en laboratorio se ajustaron a una concentración inicial de $1,2 \times 10^6$ nematodos y se asumió una mortalidad natural de 15% hasta su aplicación. La época de inoculación de las trozas con tratamientos correspondió al mes de mayo del año 2012.

Tabla 1.- Tratamientos y preparación de dosis en el experimento I, de inoculación inundativa de *D. siricidicola*, aumentando la concentración de nematodos por dosis. Decimales fueron omitidos.

Tratamiento	Dosis de nematodos (a)	Agua (ml)	Gel (g)	Nematodos /ml	Nematodos /orificio (b)	Nematodos /troza 2m	Nematodos /arbol (c)
Control	NA	1000	20	0	0	0	
0,5X	0,5	990	20	510	642	13476	121288
3X	3	940	20	3060	3850	80859	727729
6X	6	880	20	6120	7701	161718	1455458
12X	12	760	20	12240	15402	323435	2910917

NA: no aplica

(a) 1 dosis = Formulada con 1,2 millones nematodos y aplicada con 1,1 millon nematodos por mortalidad natural

(b) Volumen de solución recibido por orificio = 1,25 ml

(c) Se estimó utilizando la altura promedio de los árboles inoculados (18 metros), hasta un DLU 5 cm.

2.4.2.- Experimento II: Inoculación inundativa variando el espaciamiento de las inoculaciones

En este experimento los tratamientos consistieron en aplicar una dosis estandarizada de 1020 nematodos viables por ml y orificio de inoculación, sobre trozas en las cuales se probaron distinto número de perforaciones para inocular *Deladenus* (Tabla 2). De esta forma, la inoculación inundativa de nematodos se realizó en función de la densidad de perforaciones de cada tratamiento (Fig. 5), recibiendo cada orificio de inoculación un volumen de 1,25 ml de solución. Se seleccionaron ocho árboles distintos a los del otro experimento a los cuales se aplicó el mismo algoritmo de selección de trozas para los tratamientos utilizados en el experimento I (Fig. 4), con troncos que tuviesen al menos una longitud de 8 m para inocular los tratamientos. Cada tronco fue dividido en cuatro secciones de dos metros cada una, a las que se asignaron aleatoriamente los tratamientos experimentales de inoculación.

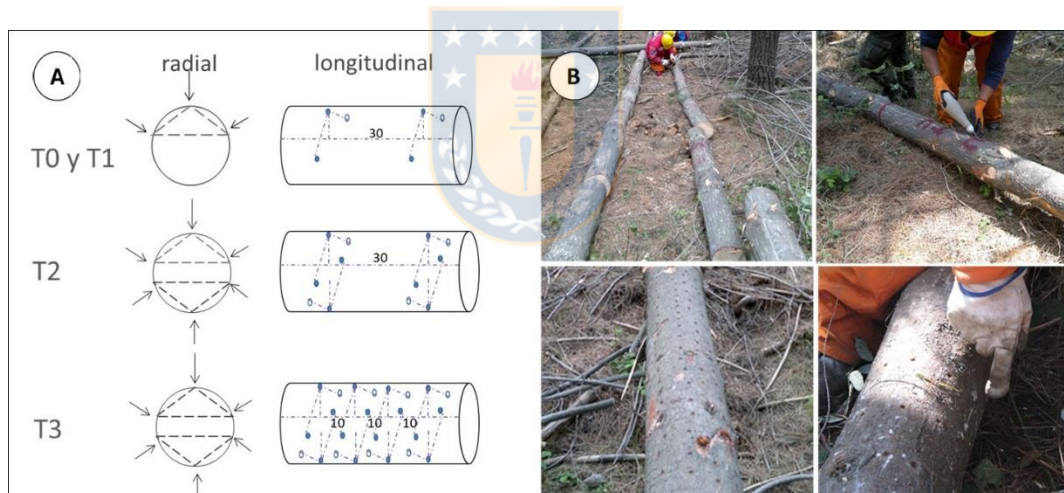


Figura 5. A: Esquema de perforaciones efectuadas a las trozas de 2 m de longitud. **B:** Secuencia operaciones: marcar y asignar tratamientos a los árboles, ejecución perforaciones según tratamiento e inoculación de dosis de nematodo.

El período de inoculación de los tratamientos se efectuó en el mes de mayo del 2012 utilizando el mismo protocolo de inoculación del experimento I, que consideró además la identificación y manejo del material (sellado con parafina, etiquetado y disposición en terreno), para finalmente llevar las trozas a cámaras de crianza durante el mes de noviembre.

Tabla 2.- Tratamientos del experimento II de inoculación aumentativa de nematodos, mediante aumentos en la densidad de orificios de inoculación de *D. siricidicola*. Decimales fueron omitidos

Tratamiento	N° Inoculaciones/ troza (2 m)	Dosis equivalente nematodos (a)	Nematodos /ml (b)	Nematodos /orificio	Nematodos /troza 2m	Nematodos /arbol (c)
Control	21	NA	0	0		
1X	21	1	1020	1283	26953	242576
2X	42	2	1020	1283	53906	485153
4X	84	4	1020	1283	107812	970306

(a) Equivalencia por concentración de nematodos aplicados en trozas inoculadas

(b) Se utilizó dosis base de 1,2 millones de nematodos, asumiendo 15% mortalidad natural

(c) Se estimó utilizando la altura promedio de los árboles inoculados (18 metros), hasta un DLU 5 cm.

2.5.- Evaluación de trozas inoculadas e instalación de cámaras de crianza

Durante la última semana de noviembre del 2102, se retiraron las trozas de cada tratamiento para colocarlas en cámaras de crianza. Para ello desde cada árbol inoculado se cortaron por la mitad las trozas de dos metros correspondientes a cada tratamiento, generando dos trozas de un metro que fueron colocadas en una cámara de crianza (tambor de 1 x 0.6 metros), que se completó con otras dos trozas de un metro y del mismo tratamiento, provenientes de un segundo árbol. Este proceso se repitió con todas las trozas totalizando 36 cámaras de crianza; 20 correspondientes al experimento I y 16 del experimento II, correspondientes a las cuatro repeticiones de cada tratamiento. Hubo algunas cámaras donde no fue posible disponer de las cuatro trozas por su tamaño, y en ese caso se colocó la faltante en otra cámara debidamente identificada con la información de experimento (I o II), tratamiento y número de repetición. Las cámaras de crianza fueron dispuestas en instalaciones especialmente acondicionadas al aire libre, contando con techo para protección de la lluvia y ubicadas en un predio de F. Arauco (Los Nogales) en la comuna de Santa Bárbara (dentro de las áreas de cuarentena vigentes a la fecha). La revisión de las cámaras se efectuó semanalmente, extrayendo todos los especímenes adultos de Sirex emergidos, los que fueron colocados en frascos con alcohol 70% debidamente etiquetados. Estos se enviaron al laboratorio de la empresa Bioforest SA., subsidiaria de Forestal Arauco, donde se procedió a disectar las hembras de Sirex para determinar la presencia o

ausencia de *D. siricidicola*.

2.6.- Análisis de datos

Se utilizó estadística Bayesiana para analizar la variable de respuesta: hembras de *S. noctilio* emergidas desde las cámaras de crianza y parasitadas por *D. siricidicola*. Se asumió que esta variable presenta una distribución binomial aleatoria, realizándose el análisis estadístico por separado para cada sitio o predio de estudio y así evitar, efectos confundidos por el parasitismo basal presente. Para la proporción de hembras parasitadas (y_i), una distribución beta fue asignada a priori e intervalos Bayesianos de credibilidad para cada proporción (π), fueron calculados utilizando el software WinBUGS (Bayesian Inference Using Gibbs Sampling) (Lunn *et al.* 2000). El muestreo por cadenas de Gibbs fue realizado con 11000 iteraciones, de las cuales 1000 iniciales fueron usadas como “burn-in” o de inicialización.



3.- RESULTADOS

3.1.- Experimento I: Inoculación inundativa de nematodos utilizando diferentes concentraciones de dosis

Un total de 650 hembras adultas de *Sirex* emergieron desde las cámaras de crianza provenientes del sitio El Quillay, de los cuales 222 se encontraron parasitadas por el nematodo *Deladenus*, mientras que en el sitio correspondiente al predio La Dicha la emergencia total de hembras alcanzó a 1037 especímenes, con 381 de ellos parasitados. Los resultados obtenidos en ambos sitios de estudio mostraron aumentos significativos en el nivel de parasitismo de las hembras de *Sirex*, respecto a los del tratamiento control de árboles sin inocular (Fig. 6).

Para el sitio El Quillay se obtuvo un 28,3% de parasitismo natural desde las hembras emergidas de trozas no inoculadas (control), aumentando 13,2 puntos porcentuales respecto al año anterior. Este nivel de parasitismo natural, fue significativamente menor que los tratamientos de inoculación aplicados (Tabla 3, Figura 6). La inoculación de una dosis equivalente al 50% de la utilizada usualmente como estándar operacional (0,5X esto es: el

equivalente a colocar 510 nematodos por ml en cada orificio de inoculación), tuvo una respuesta en el parasitismo de las hembras de *Sirex* de 50,3%, que representa una ganancia neta de 22 puntos porcentuales en la tasa de parasitismo. Al aumentar la concentración de nematodos tres veces (3X) se obtuvo un nivel de parasitismo de 79,9%, con una ganancia neta de casi 30 puntos porcentuales respecto al tratamiento anterior (0,5X) y no difiere significativamente, del obtenido al aumentar 6 veces la concentración de nematodos (6X) que tuvo un 75% de hembras parasitadas. Finalmente, la concentración de 15402 nematodos por orificio (12X) obtuvo un 69,7% de parasitismo, que no difiere estadísticamente de los valores evaluados en los tratamientos con menor concentración de nematodos (0,5X, 3X o 6X, respectivamente).

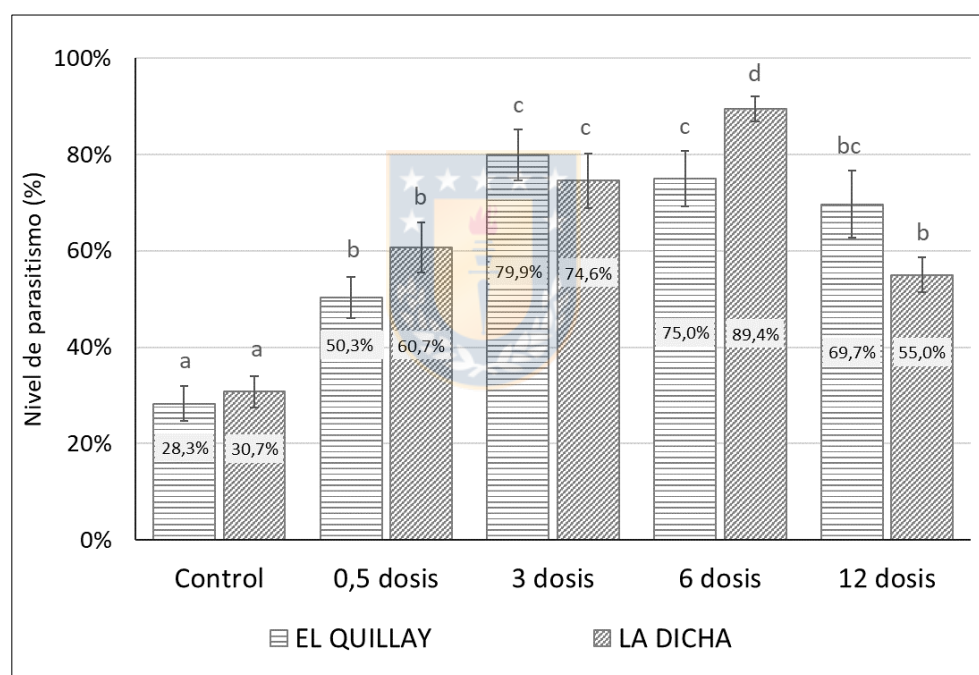


Figura 6. Niveles de parasitismo de hembras de *Sirex noctilio* obtenidos en los sitios El Quillay y La Dicha, para los tratamientos del ensayo de inoculaciones inundativas de *Deladenus* modificando la concentración de dosis de inoculación.

Por otra parte, tendencias similares fueron observadas en el sitio La Dicha, con incrementos progresivos en el nivel de parasitismo a medida que aumentó la concentración de nematodos. El control obtuvo un 30,7% de parasitismo, incrementándose 19,3 puntos porcentuales respecto a la tasa de parasitismo natural, obtenida en la temporada anterior. Los

intervalos bayesianos de credibilidad mostraron que hubo diferencias significativas de parasitismo, entre las concentraciones de 0,5 (0,5X), 3 (3X) y 6 veces (6X) la dosis operacional de control biológico con nematodos, obteniéndose tasas de 60,7%, 74,6% y 89,4% respectivamente. La mayor ganancia neta en parasitismo fue de 28,7 puntos porcentuales, obtenida al comparar la dosis de 0,5X con la de 6X, equivalente a inocular 7701 nematodos versus los 642 ejemplares por punto de inoculación para la dosis 0,5X. Sin embargo, al incrementar en 12 veces la dosis inoculada (12X), con 15402 nematodos por orificio, se observó una disminución significativa en la tasa de parasitismo evaluada, alcanzando un 55,0%, que no difiere estadísticamente del 60,7% de parasitismo obtenido en el tratamiento del 50% de dosis inoculada 0,5X.

Tabla 3.- Parasitismo promedio de hembras de Sirex, obtenidos para los tratamientos del ensayo de inoculación inundativa de *Deladenus siricidicola* a través de dosis incrementales (experimento I), durante el período estival del año 2013 para ambos sitios de estudio.

Tratamientos	Hembras Sirex emergidas		Media ¹	SD	MC error ²	Mediana	Intervalo de credibilidad	
	Total	Parasitadas					2,5 %	97,5 %
EL QUILLAY								
Control	143	40	0,283 a	0,036	3,85E-01	0,283	0,213	0,357
0,5X: 0,5 dosis	137	69	0,503 b	0,042	4,57E-01	0,503	0,419	0,587
3X: 3 dosis	53	43	0,799 c	0,053	5,35E-01	0,799	0,681	0,891
6X: 6 dosis	54	41	0,750 c	0,057	5,97E-01	0,750	0,629	0,854
12X: 12 dosis	41	29	0,697 bc	0,069	6,05E-01	0,697	0,553	0,822
LA DICHA								
Control	187	57	0,307 a	0,033	3,56E-01	0,307	0,243	0,373
0,5X: 0,5 dosis	87	53	0,607 b	0,051	5,04E-01	0,607	0,504	0,705
3X: 3 dosis	57	43	0,746 c	0,056	5,13E-01	0,746	0,629	0,847
6X: 6 dosis	140	126	0,894 d	0,025	2,49E-01	0,894	0,839	0,938
12X: 12 dosis	185	102	0,550 bc	0,035	3,27E-01	0,550	0,478	0,620

¹ valores promedios con la misma letra, no son significativamente distintos según intervalo Bayesiano de credibilidad.

² error de Monte Carlo (MC) y proporción de intervalo de credibilidad (π) fueron calculados usando muestreo Gibbs.

3.2.- Experimento II: Inoculación inundativa variando el espaciamiento de las inoculaciones

En las cámaras de crianza correspondientes a los tratamientos del experimento II, emergieron un total de 525 hembras de *Sirex* para el sitio El Quillay y 527 para La Dicha, de las cuales se encontraban parasitadas 207 y 191 hembras, respectivamente en ambos sitios. En el sitio El Quillay se obtuvo un 24,5% de parasitismo natural, tasa significativamente inferior a los resultados de parasitismo obtenidos con el resto de los tratamientos de inoculación aplicados, que variaron entre un 80,6% para el tratamiento equivalente a 1 dosis (1X), 84,6% con 2X (2 dosis) y 72,3% obtenido con la inoculación de 4 dosis de nematodos (4X) (Figura 7). Estos resultados de parasitismo de inoculación artificial no difirieron significativamente entre ellos, al estar dentro del mismo intervalo bayesiano de credibilidad (tabla 4).

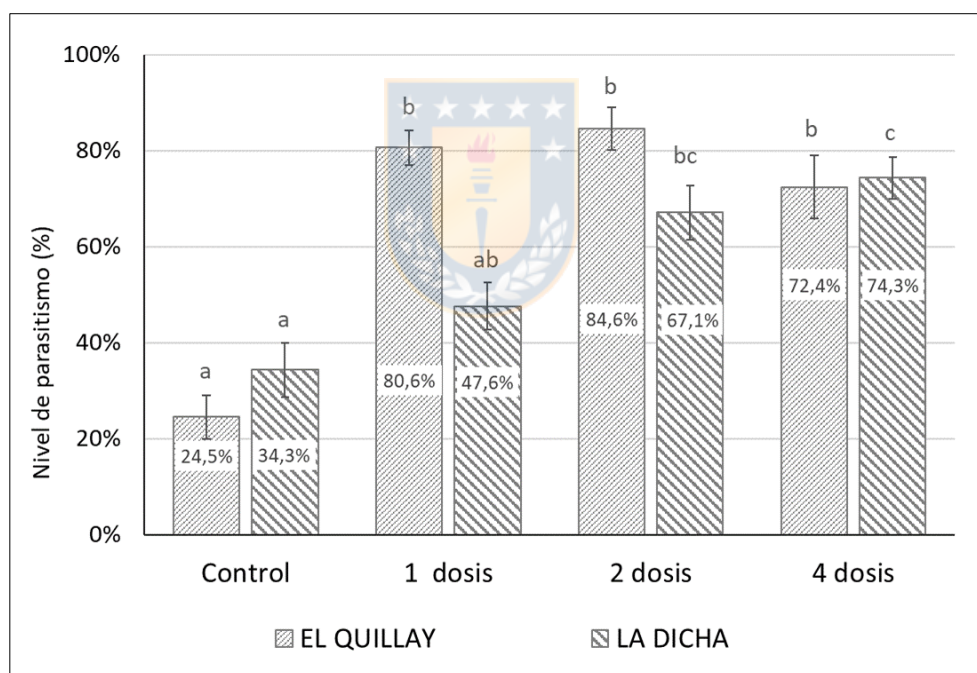


Figura 7. Niveles de parasitismo de hembras de *Sirex noctilio* obtenidos en los sitios El Quillay y La Dicha, con tratamientos inundativos de *Deladenus* (1X, 2X y 4X) basados en variaciones del espaciamiento de inoculaciones (Experimento II).

En el predio La Dicha, la inoculación de 1 dosis operacional (1X) obtuvo un 47,6% de parasitismo, mientras la inoculación aumentativa de 2 dosis (2X) llegó a 67,1% y cuadruplicar

la concentración de nematodos (4X), se alcanzó un 74,3%. Estas dos últimas tasas de parasitismo no presentaron diferencias significativas entre ellas, que si se observaron, al comparar la inoculación de una dosis (1X) con cuatro de ellas (4X), resultando en un incremento neto de 26.7 puntos porcentuales en el parasitismo.

Tabla 4.- Parasitismo promedio de hembras de *Sirex*, para los tratamientos del ensayo de inoculación inundativa de *Deladenus siricidicola* a través del incremento en la densidad de orificios de inoculación (experimento II), durante el período estival del año 2013 para los dos sitios de estudio.

Tratamientos	Hembras <i>Sirex</i> emergidas		Media ¹	SD	MC error ²	Mediana	Intervalo de credibilidad	
	Total	Parasitadas					2.5 %	97.5 %
EI QUILLAY								
Control	88	21	0,245 a	0,044	4,13E-01	0,245	0,162	0,338
1X: 1 dosis	122	99	0,806 b	0,035	3,47E-01	0,806	0,731	0,869
2X: 2 dosis	63	54	0,846 b	0,044	4,38E-01	0,846	0,749	0,922
4X: 4 dosis	45	33	0,724 b	0,065	7,35E-01	0,724	0,586	0,841
LA DICHA								
Control	68	23	0,343 a	0,056	5,94E-4	0,343	0,236	0,457
1X: 1 dosis	101	48	0,476 ab	0,048	4,63E-01	0,476	0,379	0,570
2X: 2 dosis	68	46	0,671 bc	0,056	5,48E-01	0,671	0,556	0,774
4X: 4 dosis	99	74	0,743 c	0,043	4,02E-01	0,743	0,653	0,823

¹ valores promedios con la misma letra, no son significativamente distintos según intervalo Bayesiano de credibilidad.

² error de Monte Carlo (MC) y proporción de intervalo de credibilidad (π) fueron calculados usando muestreo Gibbs.

4.- DISCUSION

Este es el primer estudio efectuado en más de 40 años, desde el trabajo de Bedding and Arkhurst (1974), donde se evalúa el efecto de inoculaciones inundativas del nematodo parasítico *Deladenus siricidicola* sobre el parasitismo de hembras de *Sirex noctilio*. En nuestro estudio el

parasitismo natural promedio, obtenido a partir del tratamiento control de ambos experimentos y ambos sitios, aumentó desde un 13,2% de la temporada anterior (2011) a 29,4% ($\pm 4,1$ SE), representando 16,2 puntos porcentuales de incremento. Este resultado es consistente con el valor de 30,8% ($\pm 12,4$ SE) reportado el 2012 para la comuna de Quilleco (Castillo *et al.* 2018), localidad donde se ubican los sitios del ensayo, demostrando que el nematodo se ha dispersado activamente desde que se inició el control biológico en esta zona el año 2010. También este aumento en el parasitismo natural sugiere que habría escasa influencia de alguno de los factores limitantes, identificados para el establecimiento exitoso de *Deladenus* (Hurley *et al.* 2008). Si comparamos esta tasa de incremento del parasitismo natural con las observadas en otras zonas geográficas, los resultados están dentro de los rangos esperados a 2 temporadas del inicio de las inoculaciones artificiales. Por ejemplo, en el sur de Chile el parasitismo observado en hembras de *Sirex* al primer año post-inoculaciones fue de 13,6%, aumentando a 29,9% y 44% para el segundo y tercer año, respectivamente (Beéche *et al.* 2012). En la Patagonia, se obtuvo 22,6% y 43,6% de parasitismo después de 1 y 2 años de iniciadas las inoculaciones, llegando en 5 años a 66,7% la tasa de infección por *Deladenus* (Corley and Villacide 2014). En consecuencia, el parasitismo natural en la zona tenía gran potencial de alcanzar altos niveles de parasitismo en pocas temporadas, lo que fue demostrado el año 2014 por Castillo (2018) que obtuvo 93,6% de parasitismo promedio en comunas de la región del Biobío, después de 5 años de iniciado el control biológico.

Los tratamientos de inoculación aumentativos por concentración de dosis, correspondientes a 3 y 6 veces (3X y 6X) de la dosis considerada operacional, obtuvieron niveles de parasitismo superiores al 75% con el nematodo parasítico. Esta cifra representa una fuerte evidencia que su aplicación en ambos sitios, contribuyó a acelerar el establecimiento y control exitoso de *Deladenus* como herramienta de control biológico de *Sirex*. Bedding (2009), sugirió que umbrales de infección sobre 75%, al cabo de 2 o 3 temporadas de aplicación de un programa de control biológico, éste podía ser considerado exitoso. Para el sitio El Quillay las dosis de 3X con 79,9% y 6X con 75%, ambas sin diferencias significativas, y la dosis de 6X en el sitio La Dicha que obtuvo un 89,4% de parasitismo, fueron los tratamientos con mayores incrementos en el parasitismo respecto al control y a la dosis operacional de 0,5X. Por otra parte, las dosis más efectivas (3X y 6X) significaron inocular entre 727729 a 1455458 nematodos por árbol en

promedio, equivalentes a 3850 o 7701 especímenes por cada punto de inoculación (orificio). Incluso la ganancia neta del tratamiento 6X en el sitio La Dicha, llegó a 58,7 puntos porcentuales respecto al control sin inocular y a 28,7 puntos con el tratamiento operacional del 50% de la dosis (0,5X). Comparativamente, inoculaciones efectuadas en Australia durante el periodo 1985 a 1989, de 2000 nematodos por orificio preparados en una solución de gelatina al 12%, redundaron en niveles de parasitismo entre 17 a 63%, obteniéndose ganancias netas respecto a árboles no inoculados, de 11 a 17 puntos porcentuales (Haugen and Underdown 1993). Sin embargo, no siempre los resultados son exitosos con el uso del nematodo a distintas densidades poblacionales. En Sudáfrica, por ejemplo, se inocularon con gel 104000 nematodos por árbol en promedio, durante el 2004 y 2005, obteniéndose un 5% y 10% de parasitismo, respectivamente (Hurley *et al.* 2007). En Australia, Haugen and Underdown (1990) utilizaron 1000 nematodos por punto de inoculación, espaciados cada 20 cm y obtuvieron niveles de infección de *Sirex* menores a 25%. Aunque factores como la pérdida de virulencia del nematodo (Australia), o las variaciones en el contenido de humedad de los árboles en Sudáfrica (Hurley *et al.* 2007), o la incompatibilidad alimenticia entre el nematodo y el hongo *Amylostereum* (Nahrung *et al.* 2016) podrían contribuir a explicar los pobres resultados de parasitismo obtenidos en esos países.

Según nuestros resultados, la inoculación de nematodos con una concentración de 6120 especímenes por ml (6X), que equivale a 1,45 millones por árbol, aumentaría la probabilidad de obtener los mayores incrementos en el nivel de parasitismo de *Sirex*, al inocular los nematodos sobre rodales recientemente atacados entre 17 y 20 años (Tabla 1, Figura 6). No es descartable tampoco utilizar una dosis 3 veces mayor (3X), que en caso del sitio El Quillay obtuvo resultados similares de parasitismo a la dosis 6X, con sólo 4.4 puntos porcentuales de diferencia entre ambas y de 27,7 en promedio al compararla con el tratamiento operacional de 0,5X. Este tratamiento, a pesar de inocular una baja dosis relativa de nematodos, equivalente al 50% de una dosis operacional promedio, duplicó el nivel de infección obtenido por las hembras de *Sirex* que emergieron del tratamiento control en nuestro ensayo. Este resultado sugiere que, una inoculación de sólo 642 nematodos por punto de inoculación, o 121288 nematodos por árbol es suficiente para mantener un programa de control biológico con pocos recursos, considerando que esta concentración (0,5X) obtuvo una ganancia neta en la tasa de parasitismo, que varió

entre 22,3 y 30 puntos porcentuales en ambos sitios respecto del parasitismo natural. Contrastando este resultado con experiencias de inoculación en Argentina y Chile, observamos que a pesar que la población de nematodos por árbol es significativamente inferior a la utilizada en ambos países; 260000 nematodos por árbol en Argentina entre 2001-2006 (Corley and Villacide 2014) y 216000 nematodos por árbol inoculados en el sur de Chile entre 2006-2009 (Beéche 2012), su aplicación en los sitios de estudio fue suficiente para obtener buenos resultados comparativos en la tasa de parasitismo (Tabla 3).

Por otra parte, la inoculación de una sobredosis de nematodos en las trozas infestadas 12 veces mayor que el tratamiento estándar (12X), que equivale a casi tres millones de especímenes por árbol, produjo niveles de parasitismo decrecientes en las hembras de ambos sitios, respecto a los niveles obtenidos con las dosis de mejor respuesta (3X y 6X). Esta disminución podría ser debido a la mayor mortalidad que sufren las larvas de *Sirex* parasitadas (Zondag 1969), causada probablemente por la mayor competencia alimenticia producida entre larvas y nematodos, por las hifas del hongo simbiote. Este proceso, podría ir incrementándose en la medida que aumenta la población de nematodos por la aplicación de inoculaciones aumentativas y llegar a constituirse en una barrera al control biológico. Hipotéticamente según Slippers (2012), esa dinámica poblacional favorecería la sobrevivencia de razas de nematodos menos virulentas, que finalmente pueden afectar el nivel de parasitismo a futuro.

Las inoculaciones inundativas a través de aumentos al número de puntos de inoculación, también mostraron incrementos significativos en la tasa de parasitismo de casi todos los tratamientos, respecto a árboles no inoculados. Estos incrementos que para el sitio El Quillay, variaron desde 56 puntos porcentuales con el tratamiento de 1 dosis operacional (1X), hasta 47,9% obtenidos al cuadruplicar la dosis (4X), no tuvieron diferencias significativas entre ellos, mostrando que no hubo evidencia que sustente cambiar la dosis y número de perforaciones actualmente utilizada en el control biológico de *Sirex* (1X). Sin embargo, las respuestas en parasitismo no fueron consistentes en ambos sitios. En La Dicha, la inoculación de una dosis de 242676 nematodos por árbol (1X), no mostró diferencias significativas respecto al control, en el nivel de parasitismo, obteniendo un 47,6%. Al aumentar la dosis al doble (2X), el parasitismo se incrementó a 67,1% pero no difiere significativamente del tratamiento operacional. Es con la inoculación del equivalente a 970306 especímenes, cuatro veces la dosis operacional (4X), que

se obtuvo un nivel de parasitismo significativamente distinto al tratamiento estándar de 1 dosis (1X), con un 74,3%. Este representó una ganancia neta de 26,7 puntos, lo cual demuestra que es posible acelerar la tasa de parasitismo en algunas condiciones de sitio. No obstante, su aplicación parece poco probable por la dificultad y mayores costos que conlleva efectuar 42 perforaciones por metro lineal de trozo, respecto a la densidad vigente de 9 a 12 puntos de inoculación.

Finalmente, nuestro estudio demostró que en algunos sitios con reciente introducción de Sirex y con bajos niveles de parasitismo (<20%), inoculaciones aumentativas de nematodos pueden ser una opción de manejo de la plaga, al incrementar significativamente los niveles de parasitismo, tanto de algunos tratamientos de inoculación y de árboles con parasitismo natural. El resultado final debería ser una reducción de la población futura de Sirex. Esta respuesta fue obtenida al inocular 1,45 millones de nematodos, mediante aumentos de 6 veces la dosis (6X). De manera similar, al cambiar el método de inoculación inundativa por incrementos en la densidad de orificios de inoculación, también se observó aumentos en el nivel de parasitismo con dosis altas de nematodos (4X), pero estos no fueron consistentes en ambos sitios. En consecuencia, por razones logísticas y de facilidad operacional, es preferible optar por incrementar significativamente la concentración de nematodos inoculados por punto de inoculación, que aumentar el número de estos en el árbol.

5.- AGRADECIMIENTOS

Para efectuar este estudio, se contó con el apoyo de muchas personas en terreno y en laboratorio, pero en especial se agradece a la Sra. Paula Slimming de Forestal Arauco zona norte, por su apoyo financiero y logístico al proyecto, a la Sra. Georgina Herrera y el Sr. José Martínez de Forestal Las Lomas por la ejecución de las tareas de terreno, a la Sra. Carolina Valiente y al personal del laboratorio de Bioforest por las tareas de fabricación de dosis y evaluaciones de parasitismo, al Sr. Eduardo Rodríguez por el apoyo de Bioforest a la consecución de este proyecto y al Sr. Rodrigo Ahumada, por su apoyo y guía técnica.

5. CONCLUSIÓN GENERAL

El desarrollo de nuevas opciones de manejo para el control de poblaciones de *Sirex noctilio* en plantaciones forestales de *Pinus radiata* ubicadas en comunas de Biobío, en la zona centro sur de Chile, tuvo varios hitos producto de esta investigación. En primer lugar, se evaluó un nuevo sistema de manejo de poblaciones de Sirex, consistente en un grupo uniforme de árboles centinela o árboles trampa delimitados sobre una superficie estándar de 1 ha. denominado Parcelas-Mega-Trampa (PMT's). Estas al ser instaladas a partir del mes de noviembre y hasta enero inclusive, lograron atraer oviposturas que generaron una población potencial de 57.901 hembras de Sirex, 5,4 veces más grande que la población obtenida en rodales control. Esta reducción de poblaciones futuras de Sirex, mediante la cosecha y posterior envío de los árboles de las MTP's a los centros de consumo, puede contribuir a disminuir futuras infestaciones de la plaga y demuestran el potencial de las MTP's como una herramienta de control etológico. También se determinó que el período adecuado para instalar MTP's, abarcó desde noviembre a enero y que los árboles trampas son atractivos a las hembras de Sirex por sobre los 90 días.

El manejo integrado de plagas, requiere conocer o estimar con cierta certeza la población presente en las zonas afectadas. Normalmente para el control de Sirex, se utiliza como herramienta primaria el control biológico o los raleos y cosechas sanitarias, para extraer poblaciones de *Sirex noctilio*. Sin embargo, en experiencias de control de Sirex efectuadas en Australia, Sudáfrica, Brasil y otros países (Hurley *et al.* 2007), no se aplicaron modelos predictivos de población y en consecuencia se implementaron prescripciones de control, sin conocer la población de Sirex presente. Eso conlleva un riesgo de no focalizar las prescripciones considerando la población de la plaga y eventualmente, tomar medidas no del todo eficaces.

Para evitar esos escenarios, y como resultado de esta tesis, se desarrolló un modelo predictivo de poblaciones de *S. noctilio* dentro de los árboles infestados. El modelo más simple, que incorpora tres muestras de 1 m de longitud y extraídas al 30%, 50% y 70% de la altura relativa del árbol, estima la población de Sirex con un razonable balance de fiabilidad estadística y costo operacional del muestreo. El mejor modelo seleccionado, además tiene la ventaja que utiliza la altura relativa como variable predictora, posibilitando su uso entonces con cualquier

edad o altura: $Y = (\text{Exp} (0.21801 + 0.25968 * \text{Ln} (X_{40} + X_{50} + X_{70}))^{3.7137}$, con Y= población de especímenes de Sirex dentro del árbol y Xi = altura relativa de la muestra de 1 m seleccionada.

Además, se desarrolló una ecuación que estima la probabilidad de infestación por Sirex en altura, basado en un modelo lineal generalizado con transformación logit. Este modelo fue significativamente afectado por el espesor de corteza, la edad y la altura de los árboles. Muestra que la probabilidad de infestación se incrementa a medida que el espesor de corteza disminuye y que esta tendencia, se mantiene acorde varía la edad y la altura de los árboles. Esto significa que el espesor de corteza se constituye en una barrera física a la ovipostura exitosa de Sirex. Otra barrera no física, que limita la distribución de las larvas en el perfil vertical de los árboles atacados, es el contenido de humedad de la madera. Se determinó que el contenido de humedad decrece a medida que aumenta la altura en árboles atacados, siendo el 40% de humedad, el valor umbral que propicia las condiciones para la sobrevivencia y desarrollo de las larvas de Sirex. Un modelo logarítmico, que muestra tendencias completamente opuestas entre árboles atacados y sanos, explica como varía el contenido de humedad con la altura relativa, aunque con bajos valores de correlación.

Por otra parte, en rodales con ataque reciente y con niveles de parasitismo bajo 20 % por *Deladenus*, al efectuar inoculaciones inundativas o aumentativas de especímenes del nematodo con dosis que variaron entre 0,5 hasta 12 inclusive, se obtuvo incrementos significativos en el parasitismo, respecto de árboles no inoculados. El aumento de la dosis por concentración del número de nematodos, a 3 y 6 veces (3X, 6X) de la dosis estándar u operacional, permitió en ambos sitios alcanzar niveles de parasitismo mayores al 75%. A nivel de respuesta individual, la aplicación de una dosis 6 veces mayor (6X), equivalente a inocular 1,45 millones de nematodos, permitió obtener ganancias en el parasitismo de 58,7 y 46.7 puntos porcentuales, respecto a árboles sin inocular, para los sitios La Dicha y El Quillay, donde el parasitismo obtenido alcanzó a 89,4% y 75%, respectivamente. La disminución de la dosis en 3 veces de la utilizada (6X), también tuvo ganancias netas en los mismos sitios, que llegaron a 43,9 y 51,6 frente al control sin inocular.

Si comparamos los resultados entre distintas dosis de inoculación, el tratamiento 6X obtuvo en La Dicha una ganancia de 28,7 puntos con el tratamiento del 50% de la dosis (0,5X) y de 24,7 en El sitio el Quillay. Estos resultados muestran que aumentos de 6 veces la dosis,

resultan en incrementos significativos del nivel de parasitismo. También, al aumentar la concentración 3 veces (3X) se obtienen incrementos en el parasitismo, comparado con la dosis 0,5X, de 13,9 y 29,6 puntos en los sitios de La Dicha y El Quillay. En consecuencia, ambas dosis (6X y 3X) son factibles de utilizar en inoculaciones operacionales para el control biológico de *Sirex*, aunque sólo la dosis mayor (6X), fue la que tuvo diferencias significativas con la dosis 3X en ambos sitios.

Al cambiar el método de inoculación por la vía de aumentar el número de puntos de inoculación sobre el tronco, con igual densidad de nematodos en cada uno de ellos, se obtuvo en uno de los sitios (La Dicha) con una dosis cuatro veces mayor (4X), un nivel de parasitismo de 74,3%, que significó una ganancia significativa respecto al tratamiento estándar operacional (1X) de 26.7 puntos. Sin embargo, ese resultado no fue consistente en el sitio El Quillay. Por ello y atendiendo a las dificultades logísticas y un mayor costo asociado de utilizar este método, es preferible optar por el método de aumentar la concentración de nematodos inoculados en cada punto de inoculación.

Finalmente, el siguiente plan de manejo hipotético ejemplifica la aplicación de nuevas opciones de manejo para el control de *S. noctilio* sobre rodales atacados: Instalación durante los meses de noviembre y diciembre, de Parcelas-Mega-Trampa (PMT's), para maximizar la tasa de oviposuras de *Sirex*. La población potencial de hembras presentes en cada PMT, es cuantificada mediante un modelo predictivo basado en ecuaciones de regresión lineal, utilizando como variables predictoras 3 trozas de 1 m extraídas a distintas alturas relativas del árbol. En las PMT's que contengan la mayor población relativa de larvas, se aplicará control biológico con nematodos utilizando inoculaciones inundativas, con una concentración de 6120 especímenes por ml., para acelerar la tasa de parasitismo en la población de hembras potenciales. El resto de las PMT, se destinará a rollizos pulpables para la destrucción de los estados biológicos presentes de *S. noctilio*.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adler, D., Murdoch, D., 2018. 3D Visualization Using OpenGL. <https://cran.r-project.org/web/packages/rgl/rgl.pdf> (accessed 12 April 2018).
- Aguayo, M., Pauchard, A., Azócar, G., Parra, O., 2009. Cambio del uso del suelo en el centro sur de Chile a fines del siglo XX: Entendiendo la dinámica espacial y temporal del paisaje. *Revista chilena de historia natural*, 82: 361-374.
- Andrew, P., 1990. A Technique to Control *Sirex noctilio* in *Pinus radiata* plantations using a parasitic nematode. Land protection division, technical Report No. 1. Department of Conservation & Environment. Keith Turnbull Research Institute. Australia.
- Bain, J., Sopow, S.L., Bulman, L.S., 2012. The *Sirex* woodwasp in New Zealand: history and current status. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 167-173).
- Bashford, R., 2008. The development of static trapping systems to monitor for wood-boring insects in forestry plantations. *Australian Forestry*, 71, 236–241
- Bashford, R., Madden, J.L., 2012. The use of kairomone lures for the detection of *Sirex noctilio* in susceptible *Pinus radiata* plantations in Australia. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 159-166).
- Bedding, R.A., 1972. Biology of *Deladenus siricidicola* (Neotylenchidae) an entomophagous-mycetophagous nematode parasitic in siricid woodwasps. *Nematologica*, 18: 482-493.
- Bedding, R.A., 1979. Manipulating the entomophagous-mycetophagous nematode, *Deladenus siricidicola*, for biological control of the woodwasp *Sirex noctilio* in Australia. Current Topics in Forest Entomology (ed. by W.E. Waters), pp. 144-147. USDA Forest Service Technical Report WO-8.
- Bedding, R.A., 1984. Nematodes parasites of Hymenoptera. In *Plant and Insect Parasitic Nematodes* (ed. by W.R. Nickle): pp. 755–795. Marcel Dekker, New York, New York.

- Bedding, R.A., 2009. Controlling the pine-killing woodwasp, *Sirex noctilio*, with nematodes. In *Use of microbes for control and eradication of invasive arthropods*: pp. 213-235. Springer, Dordrecht.
- Bedding, R.A., Akhurst, R.J., 1978. Geographical distribution and host preferences of *Deladenus* species (Nematoda: Neotylenchidae) parasitic in siricid woodwasps and associated hymenopterous parasitoids. *Nematologica*, 24: 286-294.
- Bedding, R.A., Akhurst, R.J., 1974. Use of the nematode *Deladenus siridicola* in the biological control of *Sirex noctilio* in Australia. *Australian Journal of Entomology*, 13: 129-135.
- Bedding, R.A., Iede, E.T., 2005. Application of *Beddingia siridicola* for *Sirex* Woodwasp Control Agents. In: Grewal PS, Ehlers RU, Shapiro-Ilan DI (Eds.) *Nematodes as Biocontrol* (pp. 385–397). CSIRO
- Beéche, M., Lanfranco, D., Zapata, M., Ruiz, C., 2012. Surveillance and control of the *Sirex* woodwasp: the Chilean experience. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*: (pp. 229-245). Springer, Dordrecht.
- Beéche, M., 2012. Problemas sanitarios del pino radiata: *Sirex noctilio*. Situación y marco regulatorio en Chile. Available at http://www.corma.cl/_file/seminarios/documento/silvoteca-2012.pdf (accessed 10 April 2014).
- Berryman, A.A. 1987. Insect outbreaks. In: Barbosa P, Schultz JC (eds), *The theory and classification of outbreaks*. (pp. 3-30). San Diego: Academic Press Inc.
- Bolker B. and R Core Team., 2017. Tools for General Maximum Likelihood Estimation. <https://cran.r-project.org/web/packages/bbmle/index.html> (accessed 04 June 2018).
- Bordeaux, J.M., Dean, J.F., 2012. Susceptibility and response of pines to *Sirex noctilio*. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 31-50).
- Boroczky, K., Crook, D.J., Jones, T.H., Kenny, J.C., Zylstra, K.E., Mastro, V.C., & Tumlinson, J. H., 2009. Monoalkenes as contact sex pheromone components of the woodwasp *Sirex noctilio*. *Journal of chemical ecology*, 35: 1202-1211.

- Boroczky, K., Zylstra, K. E., McCartney, N. B., Mastro, V. C., & Tumlinson, J. H., 2012. Volatile profile differences and the associated *Sirex noctilio* activity in two host tree species in the northeastern United States. *Journal of chemical ecology*, 38(2), 213-221.
- Byers, J. A., 1989. Chemical ecology of bark beetles. *Experientia*, 45: 271-283.
- Carnegie, A.J., Bashford, R., 2012. *Sirex* Woodwasp in Australia: Current management strategies, research and emerging Issues. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 175-201).
- Carnegie, A.J., Eldrige, R.H., Waterson DG., 2005. History and management of *Sirex* wood wasp in pine plantations in New South Wales, Australia. *New Zealand Journal of Forestry Science* 35: 3-24.
- Castillo, M., Sanfuentes, E., Angulo, A., Becerra, J., Romero-Romero, JL., Arce-Johnson, P., 2018. Biocontrol of *Sirex noctilio* by the parasitic nematode *Deladenus siricidicola*: A five season field study in southern Chile. *PLoS ONE* 13(11): e0207529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207529> (accessed 08 December 2018)
- Collett, N.G., Elms, S., 2009. The control of *Sirex* woodwasp using biological control agents in Victoria, Australia. *Agriculture and Forest Entomology* 11: 283-294.
- Cooperband, M.F., Böröczky, K., Hartness, A., Jones, T.H., Zylstra, K.E., Tumlinson, J.H., & Mastro, V.C., 2012. Male-produced pheromone in the European woodwasp, *Sirex noctilio*. *Journal of chemical ecology*, 38: 52-62.
- Corley, J.C., Villacide, J.M., Bruzzone, O.A., 2007. Spatial dynamics of a *Sirex noctilio* woodwasp population within a pine plantation in Patagonia, Argentina. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 25: 231-236.
- Corley, J.C., Villacide, J.M., Liebhold, A.M., 2014. Can entomophagous nematodes slow the spread of invasive pest populations? The case study of *Beddingia siricidicola* released for the management of *Sirex noctilio*. *Journal of Pest Science* 87:551-557.
- Coutss, M.P., Dolezal, J.E., 1965. *Sirex noctilio*, its associated fungus, and some aspects of wood moisture content. *Australian Forest*. 1:3-13.
- Coutts, M.P., 1969. The mechanism of pathogenicity of *Sirex noctilio* on *Pinus radiata*. II. Effects of *S. noctilio* mucus. *Australian Journal of Biology Sciences*. 22:1153-1156

- Croft, P., Hurley, B., Verleur, M., 2009. The management of *Sirex noctilio* in South Africa: Standard operating procedures for monitoring and biological control operations. ICFR Bulletin 05-2014.
- Crook, D., Fierke, M., Mauromoustakos, A., Kinney, D., Stephen, F., 2007. Optimization of sampling methods for within-tree populations of red oak borer, *Enaphalodes rufulus* (Haldeman) (Coleoptera: Cerambycidae). *Environmental Entomology*. 36:589-594.
- Crook, D.J., Böröczky, K., Zylstra, K.E., Mastro, V.C., & Tumlinson, J.H. 2012. The chemical ecology of *Sirex noctilio*. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 149-158).
- Debach, P., Rosen, D. 1991. Biological control by natural enemies (2nd Edition). Cambridge: Cambridge University Press. 456 p.
- Dodds, K.J., De Groot, P., Orwig, D.A., 2010. The impact of *Sirex noctilio* in *Pinus resinosa* and *Pinus sylvestris* stands in New York and Ontario. *Canadian Journal of Forest Research*. 40:212–223.
- Dodds, K.J., De Groot, P. 2012. Sirex, surveys and management: challenges of having *Sirex noctilio* in North America. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 265-286).
- Eager, P.T., Allen, D.C., Frair, J.L., Fierke, M.K., 2011. Within-Tree Distributions of the *Sirex noctilio* Fabricius (Hymenoptera: Siricidae) - Parasitoid Complex and Development of an Optimal Sampling Scheme. *Environmental Entomology* 40:1266-1275.
- Efron, B., 1979. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *Annals of Statistics*. 7:1-26.
- El-Sayed, A., Suckling, D., Wearing, C., Byers, J., 2006. Potential of mass trapping for long-term pest management and eradication of invasive species. *Journal of Economic Entomology* 99: 1550-1564.
- Fierke, M.K., Kinney, D.L., Salisbury, V.B., Crook, D.J., Stephen, F.M., 2005a. Development and comparison of intensive and extensive sampling methods and preliminary within-tree population estimates of red oak borer (Coleoptera: Cerambycidae) in the Ozark Mountains of Arkansas. *Environmental Entomology* 34: 184–192.

- Fierke, M.K., Kinney, D.L., Salisbury, V.B., Crook, D.J., Stephen, F.M., 2005b. A rapid estimation procedure for within-tree populations of red oak borer (Coleoptera: Cerambycidae). *Forest Ecology and Management* 215: 163–168.
- Fischbein, D., Corley, J.C., 2014. Classical biological control of an invasive forest pest: a world perspective of the management of *Sirex noctilio* using the parasitoid *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibaliiidae). *Bulletin of Entomological Research* 105: 1–12.
- Flores, F.J., Allen, H.L., 2004. Efectos del clima y capacidad de almacenamiento de agua del suelo en la productividad de rodales de pino radiata en Chile: un análisis utilizando el modelo 3–PG. *Bosque (Valdivia)*. 25: 11–24.
- Foelker, C.J., Vandenberg, J.D., Whitmore, M., Fierke, M.K., 2013. Modeling *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) Within-Tree Colonization Patterns and Development of a Subsampling Technique. *Environmental Entomology*. 42:532-538.
- FSC (Forest Stewardship Council), 2013. List of highly hazardous pesticides based on revised criteria, indicators and thresholds and a global list of pesticides. FSC Policy and Standard Unit. Final Report May 2013.
- Fukuda, H., Kajimura, H., Hijii, N., 1993. Fecundity of the woodwasp, *Sirex nitobei* Matsumura, in relation to its body size. *Journal of the Physical Society of Japan*. 75:405-408.
- Vittinghoff, E., Glidden, D.V., Shiboski, S.C., McCulloch, C.E., 2012. Regression Methods in Biostatistics: Linear, Logistic, Survival, and Repeated Measures Models. Springer-Verlag New York. 512 p.
- Haavik, L.J., Batista, E., Dodds, K.J., Johnson, W., Meeker, J.R., Scarr, T.A., Allison, J.D., 2014. Type of Intercept Trap Not Important for Capturing Female *Sirex noctilio* and *S. nigricornis* (Hymenoptera: Siricidae) in North America. *Journal of Economic Entomology*. 107:1295-1298.
- Haavik, L. J., Meeker, J. R., Johnson, W., Ryan, K., Turgeon, J. J., & Allison, J. D., 2013. Predicting *Sirex noctilio* and *S. nigricornis* emergence using degree days. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 149: 177-184.
- Hartshorn, J.A., Fisher, D.M., Galligan, L.D., & Stephen, F.M., 2015. Seasonal phenology of *Sirex nigricornis* (Hymenoptera: Siricidae) in Arkansas with implications for management of *Sirex noctilio*. *Florida Entomologist*, 98: 933-938.

- Haugen, D., 1990. Control procedures for *Sirex noctilio* in the Green Triangle: review from detection to severe outbreak (1977–1987). *Australian Forestry* 53: 24–32.
- Haugen, D., Underdown, M., 1990. *Sirex noctilio* control program in response to the 1987 Green Triangle outbreak. *Australian Forestry* 53: 33–40.
- Haugen, D., Underdown, M., 1993. Reduced parasitism of *Sirex noctilio* in radiata pines inoculated with the nematode *Beddingia siricidicola* during 1974–1989. *Australian Forestry* 56: 45–48.
- Huber, J.A., Trecaman, V.R., 2004. Eficiencia del uso del agua en plantaciones de *Pinus radiata* en Chile. *Bosque (Valdivia)* 25: 33–43.
- Hurley, B. P., Croft, P., Verleur, M., Wingfield, M. J., & Slippers, B. 2012. The control of the *Sirex* woodwasp in diverse environments: The South African experience. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 247-264).
- Hurley, B.P., Garnas, J., Cooperband, M.F., 2015. Assessing trap and lure effectiveness for the monitoring of *Sirex noctilio*. *Agricultural and Forest Entomology* 17: 64-70.
- Hurley, B.P., Slippers, B., Croft, P.K., Hatting, H.J., Van Der Linder, M., Morris, A.R., Dyer, C., Wingfield, MJ., 2008. Factors influencing parasitism of *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae) by the nematode *Deladenus siricidicola* (Nematoda: Neotylenchidae) in summer rainfall areas of South Africa. *Biological Control*. 45:450–459.
- Hurley, B.P., Slippers, B., Wingfield, M.J., 2007. A comparison of control results for the alien invasive woodwasp, *Sirex noctilio*, in the southern hemisphere. *Agriculture and Forest Entomology* 9: 159–171.
- Iede, E. T., Penteadó, S. R., & Wilson Filho, R. 2012. The Woodwasp *Sirex noctilio* in Brazil: Monitoring and Control. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 217-228).
- INFOR (Instituto Forestal)., 2014. Anuario Forestal 2014. Boletín Estadístico No 144. Santiago, Chile: Instituto Forestal.
- INFOR (Instituto Forestal)., 2017. Anuario Forestal 2017. Boletín Estadístico No 159. Santiago, Chile: Instituto Forestal.

- INFOR (Instituto Forestal)., 2019. El Sector Forestal Chileno 2018. Disponible en: https://wef.infor.cl/sector_forestal/sectorforestal.php#/0 (accesado el 13 enero 2019).
- Ismail, R., Mutanga, O., Bob, U., 2007. Forest health and vitality: the detection and monitoring of *Pinus patula* trees infected by *Sirex noctilio* using digital multispectral imagery. *Southern Hemisphere Forestry Journal* 69: 39–47.
- Ismail, R., Mutanga, O., 2010. A comparison of regression tree ensembles: Predicting *Sirex noctilio* induced water stress in *Pinus patula* forests of KwaZulu-Natal, South Africa. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* 12: S45–S51.
- Klasmer, P., & Botto, E. (2012). The ecology and biological control of the woodwasp *Sirex noctilio* in Patagonia, Argentina. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 203-215).
- Lantschner, M.V., Villacide, J., Garnas, J., Croft, P., Carnegie, A., Liebhold, A., Corley, J., 2013. Temperature explains variable spread rates of the invasive woodwasp *Sirex noctilio* in the Southern Hemisphere. *Biological Invasions*. 13:1-11.
- Lantschner, M.V., & Corley, J.C., 2015. Spatial pattern of attacks of the invasive woodwasp *Sirex noctilio*, at landscape and stand scales. PloS one, 10(5): e0127099. PLOS ONE 10(5): e0127099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127099> (accessed 22 October 2017).
- Liebhold, A.M., Tobin, P.C., 2008. Population Ecology of Insect Invasions and Their Management. *Annual Review of Entomology*. 53:387-408.
- Littell, R., Henry, P., Ammerman, C., 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Sciences* 76: 1216–1231.
- Long, S.J., Williams, D.W., Hajek, A.E., 2012. *Sirex* species (Hymenoptera: Siricidae) and their parasitoids in *Pinus sylvestris* in eastern North America. *The Canadian Entomologist*. 141:153-157.
- Madden, J.L., 1974. Oviposition Behaviour of the Woodwasp, *Sirex noctilio* F. *Australian Journal of Zoology*. 22: 341-351.
- Madden, J.L., 1971. Some treatments which render Monterey pine (*Pinus radiata*) attractive to the wood wasp *Sirex noctilio* F. *Bulletin of Entomological Research* 60: 467–472.

- Madden, J.L., 1975. An analysis of an outbreak of the woodwasp, *Sirex noctilio* F. (Hymenoptera, Siricidae), in *Pinus radiata*. *Bulletin of Entomological Research* 65: 491–500.
- Madden, J.L., 1977. Physiological reactions of *Pinus radiata* to attack by woodwasp, *Sirex noctilio* F. (Hymenoptera: Siricidae). *Bulletin of Entomological Research* 67: 405–426.
- Madden, J.L., Coutts, M.P., 1979. The role of fungi in the biology and ecology of woodwasps (Hymenoptera: Siricidae). In: *Insect–Fungus Symbiosis* (Batra, L.R. ed.) 165-258. Osmun Press, Montclair, NY.
- Madden, J.L., 1981. Egg and Larval Development in the Woodwasp, *Sirex noctilio* F. *Australian Journal of Zoology*. 29: 493-506.
- Madden, J. L. 1988. *Sirex* in Australasia. In: Berryman A.A. (Ed.). *Dynamics of forest insect populations: Patterns, Causes, Implications*. (pp. 407-429). Springer, Boston, MA.
- Martínez, A.S., Villacide, J., Fernández Ajó, A.A., Martinson, S.J., Corley, J.C., 2014. *Sirex noctilio* flight behavior: toward improving current monitoring techniques. *Entomologia Experimentalis et Applicata*.152:135-140.
- Mead, D.J., 2013. Sustainable management of *Pinus radiata* plantations. Food and agriculture organization of the United nations FAO, Rome.
- Metcalf, R. L., Metcalf, E. R., 1992. *Plant kairomones in insect ecology and control*. Chapman and Hall Ltd. London. 168 p.
- Montgomery, D.C., 2006. *Diseño y análisis de experimentos*. Editorial Limusa Wiley. México. 699 p.
- Mora, F., Perret, S., Scapim, C.A., Nunes Martins, E., Molina, M.P., 2007. Variabilidad en el florecimiento de procedencias de *Eucalyptus cladocalyx* en la Región de Coquimbo. *Ciencia e investigación agraria* 34: 131–139.
- Morgan, F.D., Stewart, N.C., 1966. The biology and behaviour of the wood-wasp *Sirex noctilio* F. in New Zealand. *Transactions Royal Society. N.Z.* 14:195-204.
- Nahrung, H.F., Ramsden, M., Griffiths, M., 2015. *Sirex* woodwasp range expansion in Australia: performance and parasitism on two commercial pine species. *Forestry*, 89: 310-315.

- Nahrung, H.F., Ramsden, M., Hayes, R.A., Francis, L.P., and Griffiths, M.W., 2016. Performance of *Sirex noctilio*'s biocontrol agent *Deladenus siricidicola*, in known and predicted hosts. *Biological Control*, 103: 54-61.
- Nahrung, H.F., 2017. *Sirex* woodwasp *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae): revisiting some past perceptions. *Austral Entomology* 56: 148-152.
- Neumann, F.G., Harris, J.A., Kassaby, F.Y., Minko, G., 1982. An improved technique for early detection and control of the *Sirex* wood wasp in radiata pine plantations. *Australian Forestry* 45: 117–124
- Neumann, F.G., Minko, G., 1981. The *Sirex* wood wasp in Australian radiata pine plantations. *Australian Forestry* 44: 46–63.
- Neumann, F.G., Morey, J.L., McKimm, R.J., 1987. The siren wasp in Victoria. Bulletin No. 29. Melbourne: Department of Conservation, Forest and Lands.
- Nielsen, T.E. and Orcutt, M.D., 2000. Herbivory and plant stress. In *The physiology of plant under stress: soil and biotic factors*. Canada, 112-1124.
- NSCS., 2002. National *Sirex* Control Strategy Operations Worksheets. National *Sirex* Control Strategy. Australia. 10p.
- Penteado, S.R.C., De Oliveira, E.B., Iede, E.T., 2000. Distribuição da vespa-da-madeira e de seus inimigos naturais ao longo do tronco de *Pinus*. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo 40: 23–34.
- Pinheiro, J.C., Bates, D.M. (EDS) 2000. Linear Mixed-Effects Models: Basic Concepts and Examples. In: *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Statistics and Computing. Springer, New York. (pp. 3-56).
- Poisson, M.A., Ahumada, R., Angulo, A.O., Muñoz, F., Sanfuentes, E., 2016. Mega-trap-plots: a novel method of *Sirex* woodwasp management on *Pinus radiata* plantations in Chile. *Southern Forests*. 78:289-297.
- R Core Team., 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-Project.org/> (accessed 10 January 2017).
- Rojas, E.P., Beéche, M.C., 2010. Detección y control de *Sirex noctilio* F. en Chile (Hymenoptera: Siricidae). In: Lanfranco D, Ruiz C (eds), *Entomología Forestal en Chile*. Valdivia: Universidad Austral de Chile. pp. 303–323.

- Ryan, K., De Groot, P., Smith, S.M., 2011. Evidence of interaction between *Sirex noctilio* and other species inhabiting the bole of Pinus. *Agricultural and Forest Entomology* 14: 187–195.
- Ryan, K., De Groot, P., Smith, S.M., 2012. Evidence of interaction between *Sirex noctilio* and other species inhabiting the bole of Pinus. *Agricultural and Forest Entomology*.14:187-195.
- Ryan, K., de Groot, P., Smith, S.M., Turgeon, J.J., 2013. Seasonal occurrence and spatial distribution of resinosis, a symptom of *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae) injury, on boles of *Pinus sylvestris* (Pinaceae). *The Canadian Entomologist*.145:117-122.
- Ryan, K., & Hurley, B. P. 2012. Life history and biology of *Sirex noctilio*. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 15-30).
- SAG. (Servicio Agrícola y Ganadero), 2005. Análisis e identificación de daños, estados inmaduros, adultos y enemigos naturales de *Sirex noctilio* Fabricius (Hymenoptera: Siricidae). Servicio Agrícola y Ganadero, Chile.
- SAG. (Servicio Agrícola y Ganadero), 2008. Instructivo vigilancia y control biológico de *Sirex noctilio* (Hym., Siricidae) mediante árboles cebo I-PA-FO-026. Santiago, Chile: Servicio Agrícola Ganadero, División Protección Agrícola.
- SAG. (Servicio Agrícola y Ganadero), 2010. Informativo Fitosanitario Forestal N° 4. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile.
- SAG. (Servicio Agrícola y Ganadero), 2015. Áreas bajo cuarentena de *Sirex noctilio* calificadas según riesgo de dispersión en madera hospedante. Programa control oficial *Sirex noctilio* en Chile. Available at http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/mapa_cuarentena_sirex.pdf (accessed 15 August 2015).
- SAG. (Servicio Agrícola y Ganadero), 2018. Áreas bajo cuarentena de *Sirex noctilio* calificadas según riesgo de dispersión en madera hospedante. https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/mapa_cuarentena_sirex_0.pdf (accessed 20 December 2018).
- Sarkar, D., 2008. Lattice: Multivariate Data Visualization with R. Springer, New York.

- Sarkar, D., Andrews F., 2016. latticeExtra: Extra Graphical Utilities Based on Lattice. <https://CRAN.R-project.org/package=latticeExtra> (accessed 15 April 2018)
- Sarvary, M.A., Cooperband, M.F., Hajek, A.E., 2014. The importance of olfactory and visual cues in developing better monitoring tools for *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). *Agriculture and Forest Entomology* 17: 29-35.
- Siegert, N.W., McCullough, D.G., Poland, T.M., Heyd, R.L., 2017. Optimizing use of girdled ash trees for management of low-density emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae) populations. *Journal of Economic Entomology*. 110: 1096-1106.
- Slippers, B., Hurley, B. P., Mlonyeni, X. O., de Groot, P., & Wingfield, M. J. 2012. Factors affecting the efficacy of *Deladenus siricidicola* in biological control systems. In: Slippers B, de Groot P, Wingfield MJ (eds), *The Sirex Woodwasp and its Fungal Symbiont*. Dordrecht: Springer. (pp. 119-133).
- Slippers, B., Hurley, B.P., Wingfield, M.J., 2015. Sirex Woodwasp: A Model for Evolving Management Paradigms of Invasive Forest Pests. *Annual Review of Entomology* 60: 601-619.
- Spradbery, J.P., 1977. The oviposition biology of siricid woodwasps in Europe. *Ecological Entomology* 2: 225-230.
- Spradbery, J.P., Kirk, A.A., 1978 Aspects of ecology of siricid woodwasps (Hymenoptera, Siricidae) in Europe, North Africa and Turkey with special reference to biological control of *Sirex noctilio* in Australia. *Bulletin of Entomological Research* 68: 341-359.
- Spradbery, J.P., Kirk, A.A., 1981. Experimental studies on the responses of European siricid woodwasps to host trees. *Annals of Applied Biology* 98: 179–185.
- Talbot, P.H.B., 1977. The Sirex-Amylostereum-Pinus Association. *Annual Review of Phytopathology* 15: 41-54.
- Taylor, K.L., 1978. Evaluation of the insect parasitoids of *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae) in Tasmania. *Oecologia*. 32:1-10
- Taylor, K.L., 1981. The Sirex woodwasp: ecology and control of an introduced forest insect. In: Jones RE, Kitching RL (eds), *The Ecology of pests: some australian case histories*. CSIRO, Australia pp. 231-248.

- Tribe, G.D., Cillié, J.J., 2004. The spread of *Sirex noctilio* Fabricius (Hymenoptera: Siricidae) in South African pine plantations and the introduction and establishment of its biological control agents. *African Entomology* 12: 9-17.
- USDA., 2008. Proposed program for the control of the woodwasp *Sirex noctilio* F. (Hymenoptera: Siricidae) in the Northeastern United States. United State Department of Agriculture, USA. www.usda.org (accessed 14 October 2015).
- Venables, W.N., Ripley, B.D., 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York.
- Villacide, J.M., Corley, J.C., 2008. Parasitism and dispersal potential of *Sirex noctilio*: implications for biological control. *Agriculture and Forest Entomology* 10: 341-345.
- Villacide, J.M., Corley, J.C., 2012. Ecology of the woodwasp *Sirex noctilio*: Tackling the challenge of successful pest management. *International Journal of Pest Management*. 58: 249-256.
- Waring, K.M., & O'Hara, K.L., 2005. Silvicultural strategies in forest ecosystems affected by introduced pests. *Forest Ecology and Management*, 209: 27-41.
- Wickham, H., 2009. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wickham, H., 2011. The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*. 40: 1-29. <http://www.jstatsoft.org/v40/i01/> (accessed 12 April 2018).
- Yousuf, F., Carnegie, A.J., Bedding, R.A., Bashford, R., Nicol, H.I., & Gurr, G.M., 2014. Effect of temperature on woodwasp (*Sirex noctilio* F.) development and parasitism by the entomopathogenic nematode, *Deladenus siricidicola*. *Biological control*, 79: 67-74.
- Zeileis, A., Hothorn, T., 2002. Diagnostic Checking in Regression Relationships. *R News* 2: 7-10. <https://CRAN.R-project.org/doc/Rnews/> (accessed 12 April 2018).
- Zondag, R., 1962. A nematode disease of *Sirex noctilio* F. Interim Res. Rep. N.Z. Forest Service 1-6.
- Zondag, R., 1966. Observations on a nematode disease of *Sirex noctilio*. Production Forestry Branch Entomology Section Report N°19.
- Zondag, R., 1969. A nematode infection of *Sirex noctilio* (F) in New Zealand. *New Zealand Journal of Science* 12: 732-747.

Zylstra, K.E., DoddS, K.J., Francese, J.A., Mastro, V., 2010. *Sirex noctilio* in North America: the effect of stem–injection timing on the attractiveness and suitability of trap trees. *Agriculture and Forest Entomology* 12: 243–250.

