

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de título

**EVALUACIÓN DEL ESTATUS DE CÓPULA EN *Lobesia*
botrana Den & Shiff (Lepidoptera: Tortricidae) MEDIANTE EL
USO DE LA TÉCNICA DE LA HEMBRA CENTINELA**

DIEGO SANTIAGO ARRAZTIO ALARCÓN

SANTIAGO – CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de título

EVALUACIÓN DEL ESTATUS DE CÓPULA EN *Lobesia botrana* Den & Shiff (Lepidoptera: Tortricidae) MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA DE LA HEMBRA CENTINELA

EVALUATION OF COPULA STATUS IN *Lobesia botrana* Den & Shiff (Lepidoptera: Tortricidae) BY USING THE SENTINEL FEMALE TECHNIQUE

DIEGO SANTIAGO ARRAZTIO ALARCÓN

SANTIAGO – CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EVALUACIÓN DEL ESTATUS DE CÓPULA EN *Lobesia*
botrana Den & Shiff (Lepidoptera: Tortricidae) MEDIANTE EL
USO DE LA TÉCNICA DE LA HEMBRA CENTINELA**

**Memoria para optar al título profesional de Ingeniero
Agrónomo**

DIEGO SANTIAGO ARRAZTIO ALARCÓN

Profesor Guía	Calificaciones
Sr. Tomislav Curkovic S. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	7.0
Profesores Evaluadores	
Sr. Luis Sazo R. Ingeniero Agrónomo.	6.8
Sr. Victor Escalona C. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6.5

SANTIAGO – CHILE
2016

Agradecimientos

A mi familia, mis padres **Fernando** y **Carolina** y mi hermano **Pedro**, mis mosqueteros y yo su D'Artagnan. A mi pequeño **Iker** y mi fiel compañera **Constanza**. A mi abuela **Tita** y a quienes no tengo cerca pero desearía estuvieran aquí, mi tío **Fernando Jorge**, mi abuelo **Joaquín** que lo extraño todos los días. A mis amigos Gabriel y Felipe que migraron de Curicó a darme risas. A la “pandilla”, en especial a mi fiel compañero “Don Graf” por alegrar todos los años de universidad y apoyar durante las extensivas jornadas y arrancar de los trabajos muy duros.

A todos ustedes muchas gracias por acompañarme siempre, por apoyarme cuando lo necesité y por seguirlo haciendo. Esta publicación significa un fin de ciclo, un cambio de aire para inspirar un nuevo inicio que, obviamente, seguirá siendo acompañado por todos ustedes.

Agradezco aparte a mi profesor Tomi, por la paciencia y dedicación que ha tenido durante el desarrollo de esta memoria y durante los otros trabajos que hemos realizado juntos. Agradezco a FDF por brindar material y equipo para que yo pudiese trabajar bajo las condiciones exigidas por el SAG.

No soy un hombre de muchas palabras, por eso quedó la mitad de esta hoja en blanco y la memoria tan cortita. Gracias.

ÍNDICE

Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Morfología.....	8
Reproducción.....	9
Conducta sexual	9
Confusión sexual (Mating disruption).....	10
Hembra centinela.....	11
Objetivo general	12
Objetivos específicos.....	12
Materiales y métodos	13
Lugar de estudio	13
Colonia	13
Equipamiento Laboratorio Universidad de Chile.....	13
1. Materiales.....	14
1.1 Arenas de observación.....	14
1.2. Plataformas para hembra centinela con ala amarrada.....	14
1.3. Jaula cilíndrica	14
2. Metodología.....	15
2.1. Sexado.....	15
2.2. Estimación de la edad a la cópula.....	16
2.3. Caracterización de la <i>bursa copulatrix</i>	16
2.3.1. Disección de abdómenes y extracción de <i>bursae</i>	16
2.4. Duración de la <i>bursa copulatrix</i> expandida.....	17
2.5. Métodos de confinamiento de hembras.	17
Análisis estadístico	19
Estimación de la edad a la cópula.....	19
Caracterización de la <i>Bursa Copulatrix</i>	20

Duración de la <i>bursa copulatrix</i> expandida.....	20
Métodos de confinamiento de hembras	20
Resultados y discusión	21
Edad a la cópula y ovipostura	21
Caracterización de <i>bursa copulatrix</i>	22
Duración de la <i>bursa copulatrix</i> expandida.....	23
Métodos de confinamiento.....	24
Conclusiones	26
Bibliografía	27
Apéndice 1	30

Resumen

En Chile, *Lobesia botrana* es una plaga sometida a una campaña de erradicación/contención por el SAG, y su manejo emplea la confusión sexual (CS) como una herramienta fundamental, la cual es normalmente evaluada respecto del impacto en los machos (capturas en trampas) o, indirectamente, por los daños producidos en los cultivos infestados. El presente estudio abordó el desarrollo de las bases para implementar la técnica de la “hembra centinela”, confinando hembras vírgenes por un tiempo acotado y evaluando, luego, su estatus de cópula. En teoría, una hembra en esas condiciones (CS) no debería copular, o bien hacerlo en baja proporción. Para el estudio, se utilizaron pupas proporcionadas por FDF (colonia oficial autorizada por el SAG) y los estudios se desarrollaron en laboratorio, bajo bioseguridad, evaluando en hembras adultas: edad a la copula; dimensiones de la *bursa copulatrix* en vírgenes y copuladas, y su conservación fijadas en alcohol en el tiempo. Adicionalmente, se evaluaron dos métodos de confinamiento (con un ala amarrada a una plataforma vs. libres en jaulas de acceso restringido). Se midió los respectivos % de cópula al exponerlas a machos vírgenes. Se observó que las hembras son capaces de copular y oviponer entre las 24 y 48 horas después de la emergencia desde la pupa. La *bursa copulatrix* de una hembra virgen mide $0,9 \pm 0,03$ mm de largo x $0,2 \pm 0,01$ mm de ancho, mientras que en una hembra cubierta (copulada) mide $1,1 \pm 0,5$ x $0,5 \pm 0,3$ mm, y permanece en esas condiciones por al menos 30 días conservada en alcohol. Entonces, la medición de la *bursa* constituye un criterio objetivo para determinar el estatus de cópula de una hembra. Las hembras vírgenes confinadas fueron capaces de copular bajo ambos métodos de confinamiento, 92% con ala amarrada y 64% en jaula sin CS. Estos antecedentes servirán para evaluar estos métodos en condiciones confinadas en campos tratados con CS, para definir su utilidad en determinar el éxito de la confusión y/o la ocurrencia de cópulas cuando se emplea esta estrategia de manejo.

Palabras clave: *bursa copulatrix*, comportamiento de cópula, confusión sexual, manejo integrado de plagas.

Abstract

Lobesia botrana is a pest under an eradication campaign by SAG in Chile, which uses mating disruption as key pest management, that can be evaluated by the impact on male (trap captures) or, indirectly, by the damage in the host. This study attempted to develop and establish the foundations to find other way to evaluate this strategy. We study the “sentinel female technique”, which consists into confine virgin females in MD treated sites for a given time to measure the *mating status* that should be reduced significantly under these conditions. With this objective, we used pupae from the FDF colony (official colony authorized by SAG) and it was studied in laboratory, under biosecurity conditions, evaluating in adult females: age at mating; *bursa copulatrix* morphometric dimensions in virgin and copulated females, and its duration in time; two confinement methods were evaluated (one wing tight on a platform vs. small cages with restriction to get out), and its respective % of mating after exposure to virgin males. Oviposition occurred between 24 and 48 hours after the emergency from pupae. *Bursa copulatrix* measures were $0,9 \pm 0,03$ (length) x $0,2 \pm 0,01$ mm (width), while a copulated female has $1,1 \pm 0,5$ x $0,5 \pm 0,3$ mm of *bursae*. These dimensions persisted about 30 days. Thus, the *bursa copulatrix* becomes an objective parameter to determinate the mating status of a female. In both methods, females were able to copulate (92% in wing tight and 64% in small cages). These data should be useful to evaluate these methods under MD in fields to define if this is a useful method to evaluate the efficacy of MD and/or the occurrence of copula.

Keywords: *bursa copulatrix*, mating behavior, mating disruption, integrated pest management

Introducción

Lobesia botrana Den & Shiff (Lepidoptera: Tortricidae), la polilla europea del racimo, está presente en la totalidad de los países de Europa, además de algunos en el continente asiático, como Israel y otros en África. En los últimos años ha sido reportada en 3 países de América: Estados Unidos, Argentina y Chile (Fuentes y Slater, 2014). Si bien la literatura señala diversos hospederos frutales (Vid, Arándano, Ciruelo) y no frutales (Crataegus y Ligustro) que están presentes en forma abundante en nuestro país, *Lobesia* tiene como hospedero casi exclusivo a la Vid (Sazo, 2014). Sin embargo, durante la temporada 2014-2015 se reportaron capturas de hasta 60 mil individuos en huertos de cerezo, y alrededor de 30 mil individuos en huertos de manzanos, perales, nectarines, durazneros y damascos (Barriga, 2015)¹. Aún así, la polilla no se adapta fácilmente a otros hospederos pero, circunstancialmente, cuando el alimento es limitante y la fenología de un potencial hospedero (Ej: Carozos) coincide con el período de floración o fruto recién cuajado, *L. botrana* puede cambiarse a ese sustrato. Sin embargo, esta especie prefiere el racimo de la vid desde que aparece hasta el final de temporada (Sazo, 2014).

En Chile, *L. botrana* fue detectada y declarada como plaga cuarentenaria bajo control oficial en abril del 2008. Se encuentra mayoritariamente entre las regiones Metropolitana, y VII, pero en el país se ha reportado entre las regiones III y IX. Este insecto presenta 3 generaciones por temporada en la zona central, y cada una de ellas causa daños característicos. La emergencia del primer vuelo se inicia a finales de septiembre, con una protandria (emergen primero los machos) de algunos días, y se prolonga alrededor de 4-6 semanas, pero al final del período de vuelo predominan las hembras (Torres, 2014). Luego presenta otros dos vuelos en diciembre y febrero (SAG, 2014).

La magnitud de su daño no radica solo en que esta plaga se alimente de flores y frutos de las especies atacadas, y además ocasiona ataques fungosos en los racimos, sino que el mayor daño lo produce su presencia debido a su categoría de plaga cuarentenaria en los principales países que conforman el mercado de la fruta fresca chilena (Fuentes y Slater, 2014). Entre estos destacan: China, Brasil, Nueva Zelanda, Australia y; entre los países que esta plaga está presente, pero que se encuentra en proceso de erradicación o es considerada plaga cuarentenaria, destacan EEUU, Canadá y México (Barriga, 2015).

Morfología

El adulto es de aproximadamente 10-13 mm de envergadura alar y 6-8 mm de longitud en reposo. Su tamaño, no obstante, depende mucho de la calidad del sustrato nutritivo a lo largo del estado larvario (Torres et al., 1999). No existe dimorfismo sexual pronunciado y el diseño alar es similar entre machos y hembras. Sin embargo, los sexos son diferenciables

¹ Carlos Barriga, Asoex, en revista Red Agrícola N°73: Pp 24-29.

tanto por su morfología como por su comportamiento. Los machos, en contraste con las hembras, presentan un abdomen más delgado, poseen un peine anal de escamas modificadas y movimientos mucho más ágiles y nerviosos cuando se les molesta (Torres, 2014). Por otra parte, tanto en estado de pupa como adulto, es posible diferenciar los sexos, ya que el macho posee 12 segmentos abdominales (11 más el segmento que tiene el cremaster) y antenas más largas que la hembra, que posee 11 segmentos abdominales (10 más el segmento que tiene el cremaster) (FDF, 2014). La hembra de *L. botrana* presenta dos aberturas genitales (SubOrden Dytrisia): el “ostium”, ubicado ventralmente entre el séptimo y octavo segmento del abdomen (Van der Guest, 1991), que es el orificio copulador por donde el macho deposita el espermatóforo y; el gonoporo a través del cual emergen los huevos durante la ovipostura (Rubio y Valencia, 2009) ubicado usualmente entre el noveno y onceavo segmento del abdomen en Tortricidae (Van der Guest, 1991).

Reproducción

El aparato reproductor masculino produce los espermios, los que se transfieren a la hembra en una estructura llamada espermatóforo, una cápsula en la cual la esperma es transferida a la hembra (Chapman, 2013). En Tortricidae, éste termina su formación dentro de los ductos femeninos una vez comenzada la cópula, y finalmente es depositado en la *bursa copulatrix* (Van der Geest, 1991; Chapman, 2013), una estructura anexa del aparato reproductor femenino que está compuesta de dos partes: un ducto delgado llamado “*ductus bursae*” y un saco más amplio llamado “*corpus bursae*”, el cual tiene una o dos espinas o *signum* (Van der Geest, 1991). Las *signae* desgastan el espermatóforo de forma gradual con el movimiento de sus espinas hasta que este se rompe y libera la esperma. La entrada del espermatóforo a la *bursa* provoca que ésta se expanda, lo que permite verificar el estatus de cópula de una hembra e identificar si ésta ha sido o no copulada. Luego, los espermios migrarán desde la *bursa copulatrix* a la espermateca, donde se mantendrán hasta el momento de la fertilización del óvulo. (Chapman, 2013)

Conducta sexual

Los adultos presentan una actividad máxima durante el crepúsculo donde ocurren eventos como el llamado (donde la hembra emite la feromona para atraer al macho), vuelo orientado (la búsqueda de la hembra realizada por el macho), cortejo (fase de reconocimiento y evaluación pre-cópula), acoplamiento (encuentro sexual o cópula) y ovipostura, aunque pueden presentar actividad sexual en otros horarios, menos frecuentemente durante el alba o en días nublados (Torres, 2014).

Las hembras son usualmente monógamas (copulan con un solo macho) pero varios factores pueden promover poligamia o acoplamientos múltiples (Torres et al., 1997). Al contrario, los machos son predominantemente polígamos (Torres et al., 1995). Las hembras, 1 a 3 días tras el acoplamiento, según la temperatura, inician la puesta sobre las brácteas, los botones

florales y, más raramente, sobre el raquis de las inflorescencias, pámpanos, bayas y hojas, ya que las superficies lisas del vegetal estimulan especialmente el reflejo (conducta) de puesta (Marchal, 1912; Torres, 2014).

Confusión sexual (Mating disruption)

En los insectos voladores, principalmente en los nocturnos o crepusculares, el principal sistema de orientación para encontrar a la pareja sexual es el olfatorio. Los machos detectan los volátiles (feromona) emitidos por hembras conespecíficas y siguen la ruta de la feromona emitida al aire (pluma de olor) hasta encontrar la fuente. Es por esto que uno de los sistemas de control busca la interrupción de estos canales de comunicación mediante la liberación de grandes cantidades de componentes feromonales desde numerosas fuentes, al ambiente, que simulen e imiten a estas feromonas (Bartell, 1982), generando un efecto desorientador en los machos o confusión sexual (CS).

Los métodos de confusión sexual para el control de los principales lepidópteros de los cultivos frutícolas y vitícolas ha ido aumentando de manera constante en los últimos 10 años, llegando a tener una superficie tratada de 102 mil ha en la Unión Europea, donde 60 mil de estas están destinadas a control de *L. botrana* (CBC, 2013).

Estos métodos de interrupción de cópula, han adquirido especial importancia debido a que es un método efectivo, con muy bajo impacto ambiental, que tiene efecto específico sobre los individuos en el área tratada, generando un impedimento a las cópulas, reproducción y, consecuentemente, una reducción de individuos por un período largo de tiempo en la zona (Witzgall et al., 2008), lo que reduce el daño, el cual en el tiempo tiende a desaparecer al igual que las poblaciones de la especie objetivo. Este método es efectivo debido a que genera falsas plumas de olor, o porque saturan el ambiente de feromona lo que hace que el macho simplemente no encuentre a la hembra o que este sature sus receptores en las antenas y no efectúe su búsqueda. Sin embargo, no solo los machos de la especie se ven afectados por esto. Algunos autores han demostrado que las hembras también pueden detectar y responder a feromonas intraespecíficas (Harari et al., 2014). En algunos casos, la presencia de feromona de la misma especie, puede adelantar o atrasar el llamado de las hembras, puede afectar también la oviposición y tasa de fecundación entre otros (Palanaswamy y Seabrook, 1978).

Generalmente las fallas de estos métodos de confusión sexual son atribuidas a migración de hembras grávidas (fertilizadas en el entorno) a las zonas tratadas, provenientes de lugares que no están bajo estos tratamientos (Sexton e Il'ichev, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que existe un porcentaje de hembras que son copuladas bajo estas condiciones (CS), lo que no significa que estos métodos en determinadas circunstancias no sean totalmente eficientes en impedir todas las cópulas (Harari, 2014). Según Barriga (2015), a medida que la superficie tratada con confusión sexual vaya aumentando, habrá que ir cambiando de indicadores que muestren la población presente en una determinada zona, porque dicha técnica cancela las capturas de machos en trampas de feromonas.

Hembra centinela

La hembra centinela, es un método de evaluación en el cual se exponen por un tiempo acotado hembras vírgenes confinadas para atraer machos a ellas o a trampas. Este método permite, luego, recuperar a los individuos expuestos para medir, indirectamente, diferentes variables de la población de machos en una superficie. Quiroz (1978), aunque no utilizó el método de hembra centinela *per se*, empleó hembras vírgenes de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) en trampas, obteniendo resultados positivos en la captura de machos, capturando más de 100 machos/trampa/día. Por otra parte, Uchôa-Fernandes y Vilela (1994), utilizaron este método para comparar distintos modelos de trampas para la captura de polilla del tomate, demostrando que las trampas con “feromona natural” son específicas y sensibles a las poblaciones de machos. Además, en la respuesta de machos ante hembras vírgenes y a distintas concentraciones de feromona sintética de *T. absoluta*, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en una comparación realizada por Ferrara et al. (2001). También se ha utilizado la hembra centinela en *Lobesia botrana*, donde se demostró que, esta especie, es capaz de copular en cajas pequeñas al comparar distintas concentraciones de feromonas (CS) (Briand et al., 2012). Harari (2014) utilizó este método para determinar qué factores biológicos se ven afectados en la polilla europea del racimo al exponerla a feromona sintética y, a diferencia de Briand et al. (2012), demostró que sí existe una reducción en la habilidad reproductiva de la hembra al estar expuesta a altas concentraciones de su feromona. Además, en la bibliografía se encuentran métodos que, aunque no son llamados “hembra centinela” como tal, funcionan bajo la misma lógica, como plantea Stelinski et al. (2007) al exponer hembras vírgenes de *Tuta absoluta* (Meyrick) con un ala anterior amarrada y, como demuestran Curkovic (2004); Briand et al. (2012) y Soopaya et al. (2015) al exponer hembras encerradas en jaulas cilíndricas con aberturas para el ingreso de los machos, para luego evaluar el estatus de cópula de las hembras por la vía de la observación de la morfología de la *bursa copulatrix* conteniendo (o no) el espermátforo, entre otros métodos. Estos resultados permiten considerar el método de exposición de la “hembra centinela”, como un posible indicador que demuestre la presencia y cópula de una población de *L. botrana* en una zona bajo CS. Debido a esto se plantea validar este método para *L. botrana* en Chile.

Objetivo general

Evaluar el método de la hembra centinela en condiciones de laboratorio para generar las bases de un método para definir el estatus de cópula de *L. botrana*.

Objetivos específicos

Establecer la edad de las hembras de *L. botrana* a la cópula.

Caracterizar morfológica y morfométricamente las *bursae copulatrix* de hembras cubiertas y vírgenes de *L. botrana*.

Medir los días que la *bursa* expandida (hembra copulada) mantiene su forma (morfometría) en condiciones de laboratorio.

Evaluar dos métodos de confinamiento de hembras que permitan cópula en condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

Lugar de estudio

Colonia

Las pupas de machos y hembras de *Lobesia botrana* (Figura 1) fueron proporcionadas por la Fundación para el Desarrollo Frutícola (FDF), que cuenta con una colonia oficial autorizada por el SAG capaz de generar miles de individuos por día, ubicada en la comuna de Quilicura (Región Metropolitana, Chile), y que cumple con los estándares de bioseguridad exigidos para estos propósitos por la autoridad competente. La crianza se mantiene en una cámara de clima controlado a 23°C, 50% de humedad, 16 horas de luz, y una dieta en base a nutrientes naturales y preservantes (FDF, 2014)².



Figura 1. Hembra adulta (izq.) y macho adulto (der.) de *Lobesia botrana* (Garrido, 2009; Gilligan & Epstein, 2014).

Equipamiento Laboratorio Universidad de Chile

La disección de abdómenes de hembras de *L. botrana* se realizó con un bisturí fino (Swann Morton n°24) y pinzas de baja presión de punta fina (FST 11253-10), bajo lupa estereoscópica (40x) Mod. BLZTX-EC2, para obtener las *bursae copulatrix*, las cuales fueron medidas con pie de metro digital (Veto E5001207) y fotografiadas (Canon PowerShot SX210 IS).

² Comunicación personal con David Castro, Ing. Agrónomo, Jefe área de Entomología Cuarentenaria, Fundación para el Desarrollo Frutícola (FDF).

1. Materiales

1.1 Arenas de observación

Para elaborar las arenas se utilizaron potes plásticos cilíndricos y transparentes de 18 cm de alto x 10 cm de diámetro. Se realizó un agujero en la base para introducir una mecha de algodón con una solución azucarada al 20%. Se removió una sección de la tapa que fue cubierta con una malla de tul para permitir aireación en el interior. Cada arena se asoció a un código distinto (Figura 2).

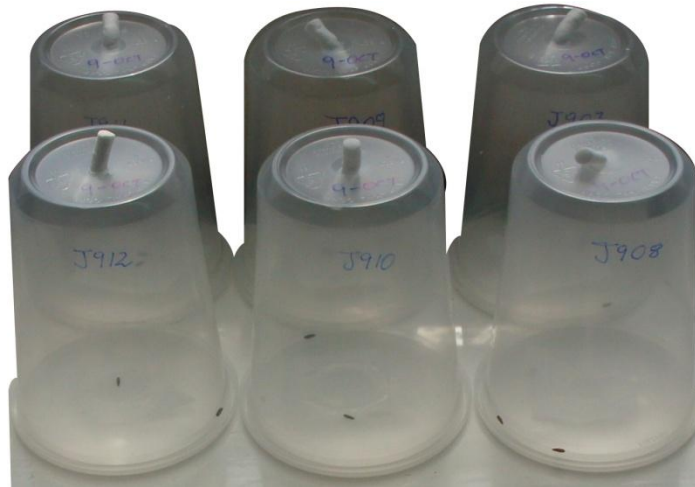


Figura 2. Arena de observación montada, con pupas de *L. botrana*.

1.2. Plataformas para hembra centinela con ala amarrada

Para el método de exposición de hembras con un ala amarrada (explicado en la sección 2.5), se utilizó una base de cartón de 8 cm de diámetro, perforado en el centro con un clip, el cual sirvió para fijar el hilo con el que se amarró el ala (Figura 6).

1.3. Jaula cilíndrica

Se utilizaron sujetadores cilíndricos de plástico para cabello (ondulines) de 6,5 cm de largo y 1,7 cm de diámetro interno, los cuales fueron cubiertos con una malla antiáfidos para evitar el escape de la hembra, de tal forma que se cubrió uno de sus extremos, mientras que el otro se dejó abierto para insertarle un cono de plástico con diámetro externo de 25-30 mm y diámetro interno de 7-8 mm, para permitir la entrada de los machos y dificultar la salida de los individuos (Figura 3).



Figura 3. Sujetadores de cabello cilíndricos (jaulas cilíndricas) sellados con malla antiáfidos y cono.

2. Metodología

2.1. Sexado

Previo a los estudios, se realizó el sexado de pupas de *Lobesia botrana*. Según los caracteres antes descritos (ver “Morfología” pag. 8-9) (Figura 4).

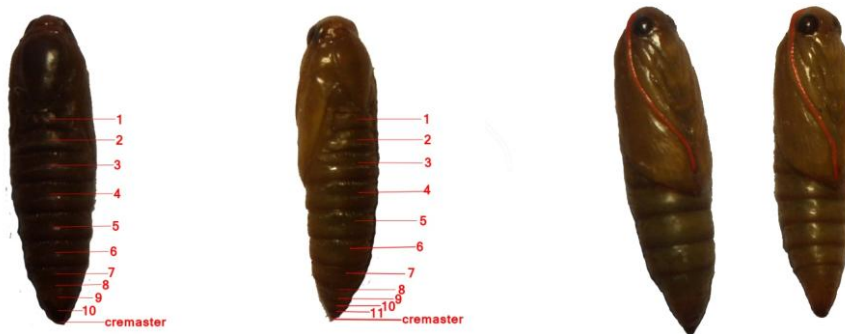


Figura 4. Imagen izquierda: Hembra (izq.) y macho (der.) mostrando diferencias según segmentos abdominales. Imagen derecha: Largos de antena de hembra (izq.) y macho (der.) de *L. botrana*.

2.2. Estimación de la edad a la cópula

Se seleccionaron pupas de 20 machos y 20 hembras y se dispuso 1 pareja por arena de observación (descrito en la sección 1.1). Se revisaron cada 15 minutos entre las 17 y las 21 horas (basado en Torres, 2014), durante tres tardes consecutivas luego de la emergencia de los adultos. Una vez emergidos los adultos, se midió el periodo de tiempo transcurrido hasta la cópula y, en caso de no observar el acople, se utilizó la ovipostura de huevos fertilizados y que posteriormente dieron origen a larvas como indicador de cópula.

2.3. Caracterización de la *bursa copulatrix*

Se colocaron 10 arenas con parejas de pupas (1 macho y 1 hembra) en cada una y, en otras 10 arenas, se pusieron 10 pupas de hembras solitarias. Estas arenas se encontraban bajo las condiciones descritas de la colonia. Los individuos se mantuvieron vivos hasta cumplir la edad media a la cópula, estimada en 2.2. Luego fueron expuestas a CO₂ dentro de la arena para inmovilizarlas y se depositaron en un frasco con alcohol al 70%, y fueron llevadas al laboratorio de la Universidad de Chile.

2.3.1. Disección de abdómenes y extracción de *bursae*

A cada hembra se le hizo un corte longitudinal en la línea media del dorso del abdomen. Este método de corte se usó ya que, por la posición de la *bursa* en el abdomen (ventral y centrada), de esta forma no se daña el *corpus* y *ductus bursae* al hacer la disección.

Se ubicó la *bursa* (por su forma característica) y se extrajo con pinzas de baja presión y punta fina y se mantuvieron en alcohol al 70%. Se caracterizó su forma y se midió el largo y ancho (en el plano ecuatorial) del *corpus bursae* con pie de metro digital de hasta 0.01 cm, bajo lupa estereoscópica (40x) (Figura 5). Los resultados se expresaron como la media (mm) ± DE.

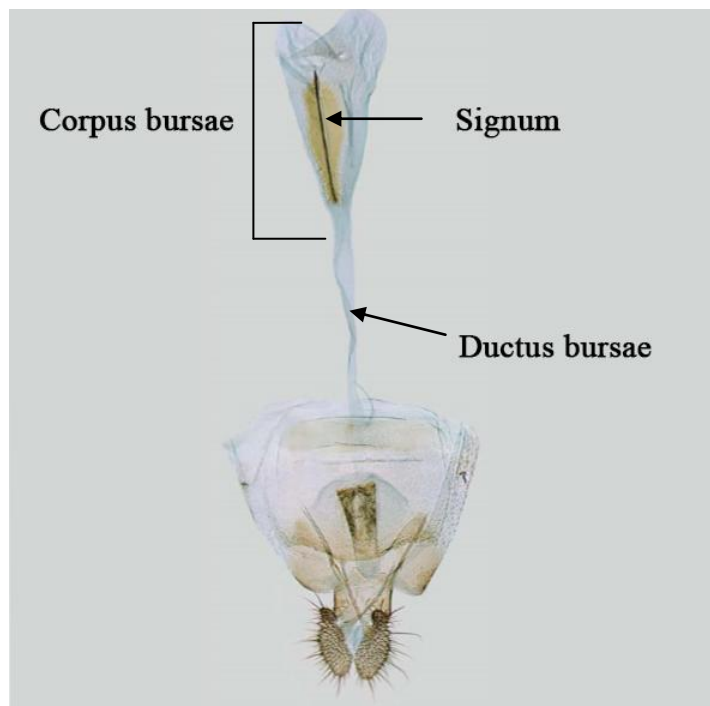


Figura 5. Genitalia de hembra de *L. botrana*, partes de la *bursa copulatrix* (Gilligan et al., 2011).

2.4. Duración de la *bursa copulatrix* expandida.

Se dispusieron 20 parejas y se procedió según la descripción hecha en la sección 2.2. Luego de la edad media de cópula se fijaron y se disectaron las hembras. Se midieron sus *bursae* como se señaló en 1.2 y luego se fijaron en una solución de alcohol al 70%. Luego se midieron las *bursae* diariamente por 30 días.

2.5. Métodos de confinamiento de hembras.

Se probaron dos métodos de confinamiento de hembras vírgenes. En el primero, se amarró un ala anterior de la hembra (Stelinski et al., 2007), de 25 hembras vírgenes de *L. botrana* previamente anestesiadas con CO₂. La manipulación se hizo manteniendo los ejemplares anestesiados en una placa Petri que estaba sobre un gel frío a 0°C, logrando mantenerla inmóvil entre 1 y 2 minutos, período durante el cual se amarró el ala anterior derecha con un hilo de algodón. El nudo se hizo primero sobre una pinza y luego, con esta misma, se tomó una de las alas anteriores y se deslizó el nudo hasta su base, apretándolo con cuidado de no cortarla. El hilo se fijó por el otro extremo a un clip situado en la superficie de una plataforma circular de cartón de 10 cm de diámetro (Figura 6) y se dejó una mecha de

algodón con una solución azucarada al 20% cerca de la hembra para que esta se alimentara. En los ensayos se usaron 25 plataformas con hembras vírgenes expuestas a machos vírgenes en baterías Flanders.



Figura 6. Plataforma de cartón con hembra de *L. botrana* con ala amarrada.

El otro método de confinamiento utilizado fue el uso de jaulas cilíndricas (descritas en la sección 1.3). Se colocó una hembra por jaula ($n = 20$) junto a una mecha de algodón con solución azucarada (20%). Se puso un cono plástico en el extremo abierto del ondulín y se depositaron las jaulas dentro de baterías tipo Flanders, donde se introdujeron posteriormente machos vírgenes. Se consideró un tratamiento testigo, con hembras no confinadas, expuestas a los machos vírgenes.

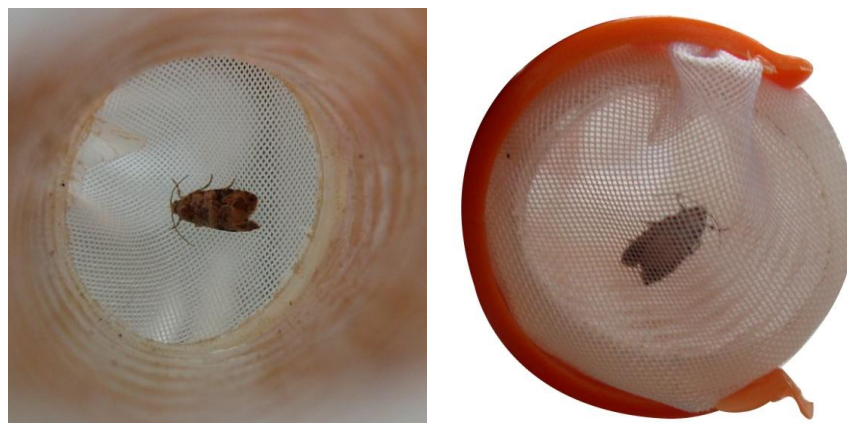


Figura 7. Jaulas cilíndricas con hembras vírgenes de *L. botrana* en el interior.

Las hembras, en las 3 condiciones (con alas amarradas, confinadas en ondulines y no confinadas), se colocaron en diferentes baterías Flanders de 50 x 30 x 30 cm. Se utilizaron 3 baterías, una para cada método de exposición (Figura 8). Se colocaron 5 machos y 5 hembras vírgenes por batería. Todos los individuos dispusieron de mechas de algodón con una solución azucarada en la batería, plataforma o jaula. Luego de 48 horas de exposición, se colectaron las hembras fijándolas en alcohol para disectarlas como se describió en la sección 2.3, y así estimar sus estatus de cópula en función de las dimensiones de la *bursa*.



Imagen 8. Baterías Flanders para evaluación del estatus de cópula de *L. botrana*.

Análisis estadístico

Estimación de la edad a la cópula

Se utilizaron 20 arenas de observación en las cuales se midió el tiempo transcurrido hasta que la hembra copulara con el macho o, en caso de no ver la cópula, hasta que esta ovipusiera huevos visiblemente fertilizados. Se consideró huevo viable aquel opaco blanquecino como fertilizado y; huevo transparente como no fertilizado dado que el embrión no se desarrolló.

Se calculó el periodo de tiempo desde que las hembras emergieron hasta que ocurrió la cópula y se calculó cuando ocurrió el mayor porcentaje de cópulas durante este periodo (48 horas).

Caracterización de la *Bursa Copulatrix*

Se extrajeron 40 *corpus copulatrix* siguiendo lo planteado en las secciones 2.2 y 2.3, a las cuales se midió largo y ancho de su plano ecuatorial. Se realizó una prueba t de student para diferenciar los tratamientos (copuladas vs. sin copular o no fertilizadas) del largo y ancho de las *bursae*.

Duración de la *bursa copulatrix* expandida

Se utilizaron todas las *bursae copulatrix* obtenidas de los distintos análisis y se midieron los *corpus bursae* por separado en alcohol y en seco a condiciones ambientales durante 30 días. Se utilizaron los parámetros:

- a) La *bursa* mantiene su forma.
- b) La *bursa* mantiene su forma contraída o expandida pero se deshidrata (el *corpus bursae* se desinfla).
- c) La *bursa* cambia de forma.

Métodos de confinamiento de hembras

Se realizó un DBCA donde cada bloque fue conformado por 3 baterías Flanders. Cada batería correspondió a un tratamiento (ala amarrada, jaula cilíndrica y testigo), con 5 hembras vírgenes expuestas a 5 machos vírgenes cada una por el periodo de tiempo estimado en la sección 2.2 (48 horas). Se hicieron 5 repeticiones para cada método de confinamiento. La unidad experimental fue una batería Flanders con 5 parejas de *L. botrana* en su interior. Los tratamientos fueron 3: Hembra con ala amarrada, hembra en jaula cilíndrica y el testigo (definidos en la sección 2.5).

Debido a que el análisis de las cópulas no resultó lineal, ya que las respuestas obtenidas son “hembra copulada” o “hembra no copulada”, el análisis estadístico se basó en un modelo lineal generalizado de respuesta binomial con función de enlace logit, con un test de verosimilitud de Wald. En el caso de existir diferencias, se procedió a realizar el test de comparación múltiple DGC (Di Rienzo et al., 2002).

Resultados y discusión

Edad a la cópula y ovipostura

El 85% de las hembras y el 80% de los machos emergió de la pupa en un plazo máximo de 10 días (Figura 9) y el 64,7% de estas hembras puso huevos fertilizados (Figura 10) dentro de ese mismo periodo. A los 14 días, emergió el 95% (Figura 9) de las hembras y el 100% de estas había ovipuesto dentro de las arenas en ese plazo (Figura 10). Se presentó un 5% de mortalidad de hembras y 0% en machos. En la Figura 9, la línea azul muestra las hembras nacidas por día, demostrándose que a partir del 8vo día se alcanzó la mayor cantidad de emergencia de hembras adultas. En rojo se aprecia la sumatoria de hembras emergidas, la cual alcanzó un total de 19 hembras vivas y 1 muerta (n = 20).

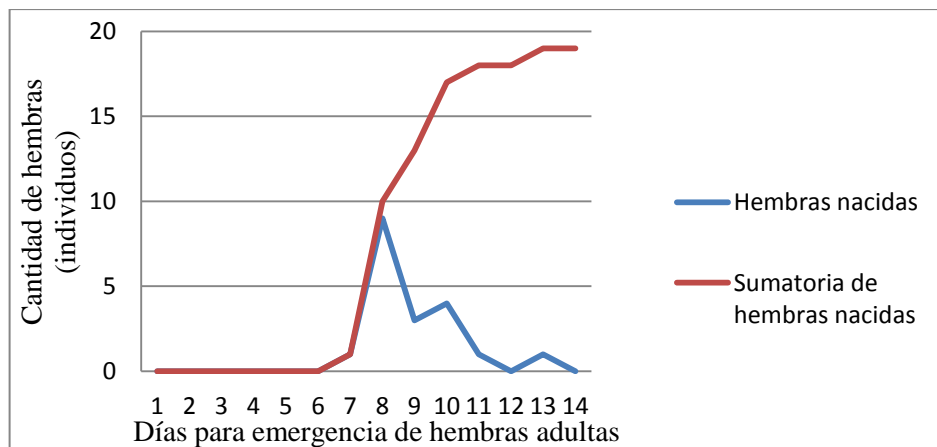


Figura 9. Emergencia de hembras de *L. botrana*. La línea azul muestra las hembras nacidas por día, en rojo se aprecia la sumatoria de hembras emergidas.

En la Figura 10, la línea azul demuestra que la mayor cantidad de oviposturas se alcanzó al décimo día, justo 2 días después de la máxima emergencia de hembras adultas. En la línea roja se ve que todas las hembras vivas fueron capaces de oviponer. Esto corresponde con los resultados de Ferro y Akre (1975) quienes dicen que los huevos aparecen en el ovario 24 horas después de la emergencia de la hembra en *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), periodo que debe cumplirse para que esta esté preparada para oviponer de forma viable. Por otra parte, Van der Guest (1991) y Chapman (2013) mencionan que, en otros grupos de Lepidoptera, el traspaso de la esperma a la espermateca puede tomar entre 12-18 horas en especies de Zygaenidae.

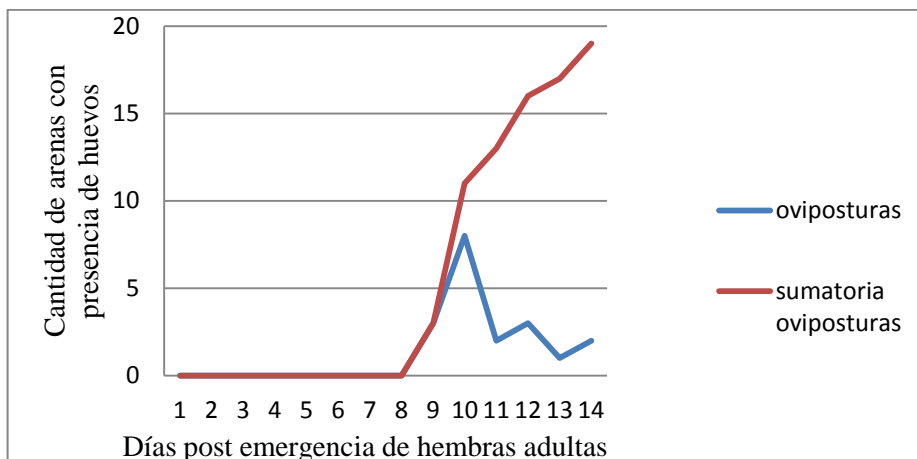


Figura 10. Oviposturas en relación a la cantidad de hembras emergidas (n = 20). La línea azul demuestra la ocurrencia de oviposturas viables en la arena. La línea roja muestra la sumatoria de arenas con oviposturas por día.

El 25% de las hembras puso huevos fertilizados a las 24 horas después de su emergencia desde la pupa. El 70% de las hembras que no habían ovipuesto a esa fecha lo hizo entre las 24 y las 48 horas desde la emergencia desde la pupa y, el 5% de hembras restantes murió previo a la emergencia. En los casos en que el macho emergió después que la hembra (20% de los machos), se vio la cópula al día siguiente. Según esto, la hembra y el macho están preparados para la cópula entre las 24 y 48 horas después de la emergencia desde la pupa.

Una vez que se detectaron oviposturas y se verificó que fueran huevos fertilizados, los individuos fueron recolectados y fijados en alcohol para posteriores análisis.

Caracterización de *bursa copulatrix*

Todas las hembras no expuestas a machos (vírgenes o no cubiertas) presentaban el *corpus bursae* contraído y la parte superior plegada (Figura 11). El ancho y largo, sin considerar los *ductus bursae* mostró que, en promedio, la *bursa*, contraída, mide $0,21 \pm 0,01$ mm de ancho en el plano ecuatorial y $0,92 \pm 0,03$ mm de largo. Por otra parte, las hembras copuladas presentaron el *corpus bursae* expandido y los pliegues que se veían en la parte superior de las *bursae* de las hembras vírgenes se estiraron, aumentando el volumen total de estas. Las *bursae* de hembras copuladas, midieron $0,50 \pm 0,03$ mm de ancho y $1,1 \pm 0,05$ mm de largo (Figura 11) (p-valor 0,001).



Figura 11. Aspecto y dimensiones de *bursa copulatrix*; copulada expandida (izquierda: hembra copulada) y virgen contraída (derecha: hembra no copulada), *L. botrana*.

Como se observa en la Figura 11, la *bursa* al estar contraída (hembra no cubierta), en la parte superior demuestra tejidos que se encuentran plegados. Una vez que la hembra es copulada y el espermatóforo depositado en su interior, la *bursa* se expande y cambia su forma, similar a lo planteado por Van der Geest (1991) y Chapman (2013).

Estos resultados muestran que las dimensiones, largo y ancho, presentan diferencias significativas entre hembras vírgenes y cubiertas, las que sirven para discriminar el estatus de cópula efectiva, es decir, si ha ocurrido la transferencia de espermios del macho a la hembra. Sin embargo, basándose en las medias y en el carácter morfológico más notable, la mejor forma para definir este estatus de cópula de la hembra es la medición del ancho del plano ecuatorial de la *bursa copulatrix*.

Duración de la *bursa copulatrix* expandida.

De los análisis realizados durante 30 días sobre las *bursae* mantenidas en alcohol al 70%, se observó que las expandidas (copuladas) mantenían su forma durante todo el periodo y, luego de esos 30 días, aún seguían conservándola con mediciones de largo y ancho de $1,0 \pm 0,03$ mm y $0,48 \pm 0,03$ mm respectivamente. Lo mismo ocurrió con las *bursas* contraídas con medidas de $0,21 \pm 0,01$ mm de ancho y $0,92 \pm 0,03$ mm de largo.

Se observaron otras *bursae copulatrix* (tomadas del primer ensayo sobre la edad a la cópula de la hembra) conservadas en seco (25°C y 30% HR), en una placa sin solución para hidratar los tejidos. Estas *bursae*, al igual que en la solución de alcohol, mantienen su forma, aunque en las primeras, el 100% de las expandidas se ven afectadas por la deshidratación y quedan aplanadas (*corpus bursae* vacío/desinflado), en cambio la *bursa* contraída queda en su forma original y se vuelve rígida.

Según esto, durante los 30 días de observación, la forma de la *bursa copulatrix* no cambia al ser extraída, ya que sumergidas en alcohol no hubo variaciones en su forma y siempre se pudo diferenciar la expandida de la contraída a la lupa. Por otra parte, al mantenerlas secas al aire, aún es posible diferenciar una de otra, pero estas se deshidratan y, en el caso de la *bursa* expandida, esta queda aplanada (desinflada) en la zona central. Sin embargo, bajo estas mismas condiciones, la *bursa* contraída se endurece pero se mantiene con la misma forma en la que se extrajo de la hembra. Cabe decir, que no hay certeza de qué ocurre con la *bursa* cuando la hembra sigue viva. No se obtuvieron registros de estos casos, por lo que no se sabe si la *bursa* se vuelve a contraer luego de liberar la esperma de su interior.

Métodos de confinamiento

En los análisis de los testigos (sin confinamiento o amarre de alas), se revisaron 25 hembras y se observó que las 25 tenían sus *bursae copulatrix* expandidas a las 48 h luego de expuestas, por lo que se concluye que las condiciones en que se expusieron a los machos eran favorables para la cópula y transferencia de espermátóforos. En las hembras centinelas expuestas con un ala amarrada se observó que 23 de las 25 hembras observadas tenían *bursae* expandidas, equivalente a 92% de cópula. En las hembras en jaulas se observó que 16 de las 25 hembras tenían la *bursa* expandida, un 64% de cópula bajo estas condiciones. Según el análisis estadístico, el tratamiento de cono demuestra diferencias estadísticamente significativas, mientras que el testigo y las hembras con un ala amarrada no demuestran ser estadísticamente distintos (p-valor 0,0003, ver Apéndice 1). No obstante lo anterior, en términos prácticos, la dificultad para amarrar el ala implica que la hembra se debe mantener anestesiada e inmóvil la mayor cantidad de tiempo posible, ya que toma entre 1 y 2 minutos manipularla para poder anudarla sin dañarla y, a esto hay que agregarle la pérdida de individuos que se dañan o mueren al montar este método. Además, serán presa fácil de depredadores en campo. Es por esto que se recomienda el método de la jaula, pues es más práctico y rápido de montar. Si bien este último, es estadísticamente inferior al del ala amarrada y al testigo, Briand et al. (2012); Suckling et al. (2012); Harari et al. (2014) y Soopaya et al. (2015) evaluaron jaulas similares con propósitos parecidos, obteniendo resultados concluyentes en ensayos de campo.

Cabe señalar que los resultados obtenidos en el presente estudio se hicieron en ambientes libres de feromona artificial de CS. En otras especies de Tortricidae como *C. pomonella* (Harari et al., 2014) u otros lepidópteros como *S. litoralis* y *E. ambiguella* (El-Sayed y

Suckling, 2005), quienes también incluyeron *L. botrana* en sus estudios, se ha demostrado que no hay reducción en la conducta de llamada de las hembras expuestas a condiciones de CS con feromonas sintéticas. Si bien, Harari et al. (2014), demostró que las hembras de *L. botrana* expuestas a su propia feromona sexual, disminuyen su capacidad de llamar, estas diferencias son leves y no significa que no ocurran estos eventos.

Otros autores, han reportado que en otras especies de Tortricidae como *Choristoneura fumiferana*, las hembras son capaces de percibir la presencia de feromona de la misma especie, lo que induce la ovipostura (Palanaswamy & Seabrook, 1978). En otros casos como *H. magnanima* y *Adoxophyes sp.* (Noguchi y Tamaki, 1985), *C. rosaceana* y *A. velutinana* (Gökçe et al., 2007), se ha demostrado que existen reducciones en el periodo de llamado de las hembras al ser sometidas a CS. Estos resultados son muy contrastantes unos de otros, por lo que es necesario confirmar si la hembra de *L. botrana* es capaz de realizar el llamado, la cópula y la ovipostura bajo condiciones de confusión sexual.

Conclusiones

El método de la hembra centinela en laboratorio permite definir el estatus de cópula de *Lobesia botrana*.

El periodo de tiempo necesario para que la hembra, un vez emergida y expuesta a machos, copule y oviponga, es 24 a 48 horas.

El tiempo que la *bursa copulatrix* extraída de la hembra permanece con la forma en la que se encontraba al momento de extirparla de la hembra es de 30 días o más en alcohol.

La mejor variable morfométrica para discriminar si una hembra ha copulado o no, es medir el ancho ecuatorial de su *bursa copulatrix*, ya que las medias de esta dimensión varían mucho más, respecto a la *bursa* de una hembra no copulada, que las de la altura y son mucho más fácilmente reconocibles.

El mejor método de confinamiento para evaluar el estatus de cópula de *L. botrana* fue amarrar un ala anterior de una hembra virgen. Sin embargo, es un método difícil de implementar, por lo que el método de confinamiento en el ondulín, aunque menos efectivo, es más eficiente por ser más práctico y sencillo.

Finalmente, es importante evaluar estos métodos de confinamiento en campo y poder medir si hay cópulas en situaciones de uso de la confusión sexual contra *L. botrana*.

Bibliografía

- Briand, F.; Guerin, P.; Charmillot, P.; Kehrli, P., 2012. Small cages with insect couples provide a simple method for a preliminary assessment of mating disruption. The scientific world journal, volumen 2012. 8pp.
- CBC, 2013. Las feromonas y el método de la confusión sexual, [Consulta en línea] <http://www.cbc-europe.it/images/stories/file/biocontrol/guide-ES.pdf>.
- Chapman, R. 2013. The insects: Structure and function. 5ta edición por Simpson, S., Douglas, A.. Capítulos 12-13: 269 – 321.
- Curkovic, T. 2004. Behavioral responses of *Choristoneura rosaceana* (Harris) and *Pandemis pyrusana* Kearfott males to attracticide sources. Ph.D. dissertation, Washington State University, Pullman, WA. 175p.
- Di Rienzo, J. A.; Guzmán, A. W.; Casanoves, F., 2002. A Multiple-Comparisons Method Based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree . Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics, Vol. 7, No.2, pp. 129-142.
- El-Sayed, A. y Suckling D., 2005. Behavioural observations of mating disruption in three lepidopteran pests. Behaviour 142:717–729.
- Fuentes E. y Slater J., 2014. *Lobesia botrana*, la plaga no da tregua. Portal frutícola, consulta en línea. [<http://www.portalfruticola.com/2014/01/20/columna-lobesia-botrana-la-plaga-que-no-da-tregua/?pais=chile>].
- Garrido, F., 2009. Plan de control contra la Polilla de la Vid. Consulta en línea [<http://agrostart.blogspot.cl/2010/09/plan-de-control-contra-la-polilla-de-la.html>].
- Gilligan, T. y Epstein, M., 2014. Tortricids of Agricultural Importance. Consulta en línea [http://idtools.org/id/leps/tortai/Lobesia_botrana.htm].
- Gilligan, T.; Epstein, M.; Passoa, S.; Powell, J.; Sage, O.; Brown, J., 2011. Discovery of *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) in California: an invasive species new to North America (Lepidoptera: Tortricidae). Proc. Entomol. Soc. Wash. 113(1): 14–30
- Gökçe, A.; Stelinski, L.; Gut, L.; Whalon M., 2007. Comparative behavioral and EAG responses of female obliquebanded and redbanded leafroller moths (Lepidoptera; Tortricidae) to their sex pheromone components. Eur. J. Entomol. 104:187–194.
- Harari A.; Zahavi, T.; Steinitz, H., 2014. Female detection of the synthetic sex pheromone contributes to the efficacy of mating disruption of the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. Pest. Mgmt. Sci. 2015; 71:316–322

Marchal, P., 1912. Rapport sur les travaux accomplis par la mission d'études de la *Cochylis* et de l' *Eudémis*. Libr. Polytech.. Paris et Liège, Paris, 326 pp.

Noguchi H. y Tamaki Y., 1985. Conspecific female sex pheromone delays calling behavior of *Adoxophyes* sp. and *Homona magnanima* (Lepidoptera; Tortricidae). Jap. J. Appl. Entomol. Zool. 29:113–118.

Palanaswamy, P. y Seabrook, W.D., 1978. Behavioral responses of the female eastern spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera, tortricidae) to the sex pheromone of her own species. J. Chem. Ecol. 4: 649-655

Quiroz, C.E., 1978. Utilización de trampas con hembras vírgenes de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) en estudios de dinámica de población. Agric. Tec. 38:94–97.

Red agrícola, 2015, octubre. Análisis y experiencia de la industria y proyecciones para la temporada 2015-2016. Red Agrícola. N°73:24-29.

Rubio, J. y Valencia, C., 2009. Estudio comparativo del sistema reproductor femenino de tres especies de Nymphalidae (Lepidoptera: Papilionoidea) de Colombia. ISSN 0123 - 3068 Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. 13 (2): 117 – 125.

SAG, 2014. [Consulta en línea]. <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/lobesia-botrana-o-polilla-del-racimo-de-la-vid>. Consulta: 20-08-2014.

Sazo, L., 2014. Entrevista revista Red Agrícola, [Consulta en línea]. http://www.redagricola.com/sites/default/files/lobesia_botrana.pdf.

Sexton, S. e Il'ichev A., 2000. Pheromone mating disruption with reference to oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). Gen. Appl. Entomol. 29:63–68.

Soopaya, R., Woods, B., Lacey, I., Viridi, V., Mafraneto, A. y Suckling, D. M., 2015. Feasibility of Mating Disruption for Agricultural Pest Eradication in an Urban Environment: Light Brown Apple Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Perth. J. Econ. Entomol. 108(4): 1930–1935.

Stelinski, L., Miller, J., Ledebuhr, R., 2007. Season-long mating disruption of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) by one machine application of pheromone in wax drops (SPLAT-OFM). J. Pest. Sci. 80: 109 – 117.

Suckling, D. M., Brockerhoff, E., Stringer, L., Butler, R., Campbell, D., Mosser, L., y Cooperband, M., 2012. Communication disruption of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) by using two formulations at four point source densities in vineyards. J. Econ. Entomol. 105: 1694–1701.

Torres L., 2014. Un aniversario aciago: dos siglos de historia como plaga de la polilla del racimo de la vid, *Lobesia botrana* Den. y Schiff.. [Consulta en línea] <http://www.seea.es/index.php/divulgacion/polilla-del-racimo-de-la-vid>.

Torres L., Rodríguez M., Roehrich R., Stockel J., 1999. Vine phenological stage during larval feeding affects male and female reproductive output of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). Bull. Entomol. Res. 89: 549-556.

Torres, L., Stockel J., Rodríguez M., 1997. Physiological factors regulating polyandry in *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). Physiol. Entomol. 22: 387-393.

Torres L., Stockel, J., Roehrich, R., 1995. Le potentiel reproducteur et ses variables biotiques associées chez le mâle de l'Eudémis de la vigne *Lobesia botrana*. Entomol. Exp. Appl., 77: 105-119.

Uchôa-Fernandes, M. A., y Vilela, E. F. 1994. Field trapping of the tomato worm *Scrobipalpaloides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) using virgin females. An. Soc. Entomol. Bras. 23:271-277.

Van der Geest, 1991. Tortricid pests: their biology, natural enemies and control. Vol. 5: 10-13.

Apéndice 1

1. TRAMPAS (Métodos de confinamiento de hembras).

Resultados para el modelo:

Lineal generalizado de respuesta binomial y función de enlace logit

Variable dependiente: cop

General

Familia	Enlace	nAGQ
binomial	logit	1

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
15	27,92	30,75	-9,96	6,40

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

Term	Chi-square	df	p-value
Tratamiento	15,92	2	0,0003

Efectos fijos

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	2,44	0,74	3,31	0,0009
TratamientoCono	-1,87	0,85	-2,20	0,0275
TratamientoTestigo	34,61	13421772,80	2,6E-06	>0,9999

Parámetros de los efectos aleatorios

RndEff	Param	Var	SD
Bloque(Intercept)		0,00	2,6E-09

cop - Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

DGC (Alfa=0.05)

Tratamiento	Media	E.E.	
Testigo	1,00	1,1E-09	A
Ala amarrada	0,92	0,05	A
Cono	0,64	0,10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)