



INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

PROYECTO

"NUEVAS CEPAS NATIVAS DE BACILLUS THURINGIENSIS, PARA EL EFECTIVO CONTROL DE TRES FAMILIAS DE LEPIDOPTERA, DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA EN LA VII REGIÓN"

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	18 ABR. 2007
Hora	12:15
Nº Ingreso	1766

EJECUTOR
BIO INSUMOS NATIVA LTDA.

ABRIL 2007



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

I. ANTECEDENTES GENERALES

Código: FIA - PI - C - 2003 - 2 - A - 052

Nombre del Proyecto: NUEVAS CEPAS NATIVAS DE BACILLUS THURINGIENSIS, PARA EL EFECTIVO CONTROL DE TRES FAMILIAS DE LEPIDÓPTERA, DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA EN LA VII REGIÓN

Región: VII

Agente Ejecutor y Asociados: Bio insumos Nativa Ltda.

Coordinador del Proyecto: Gustavo Lobos Prats.

Costo Total: \$ 56.759.750

Aporte del FIA: \$ 35.169.350

Porcentaje del costo total: 62 %

Período de Ejecución: Diciembre 2003 a Febrero 2007



4 Metodología del Proyecto:

El proyecto fue dividido en 4 etapas, las que son:

- Evaluación *in vitro*
 - Evaluación *in vivo*
 - Evaluación en campo
 - Desarrollo de un sistema de producción y transferencia
- II. Ensayos

1.- Bioensayo de Laboratorio: Determinación de las tres cepas con mayor efecto insecticida por especie, para el control de *Tuta absoluta*, *Agrotis* spp y *Pieris brassicae* esta última fue cambiada por *Plutella xylostella*.

a. Crianzas de insectos.

Dado que este Proyecto plantea una primera etapa, con ensayos controlados de laboratorio, tendientes a evaluar la actividad tóxica de las proteínas Cry del *Bacillus thuringiensis* sobre tres tipos de insectos, fue necesaria la habilitación de un espacio para la crianza *in situ* de estos organismos fitófagos. De esta forma se contará con el número adecuado de organismos para los bioensayos.

Con este objetivo, se diseñó e instaló al interior del cuarto multidisciplinario, una cámara para el cultivo de nuestros insectos blanco. Su diseño consideró los aspectos de espacio, temperatura y luminosidad (fotoperíodo) que permiten el buen desarrollo del vegetal y de sus insectos huéspedes. Se estableció un fotoperíodo de 10 horas luz (10 horas incandescente y 12 horas de luz fluorescente) y 12 horas de oscuridad.

Ejemplares de la polilla del tomate (*Tuta absoluta*), polilla de repollo (*Plutella xylostella*) y gusano cortador (*Agrotis* sp.), fueron colectadas desde plantaciones comerciales de la Región, y trasladadas al laboratorio para su crianza y multiplicación. En estado larval o adulto, los insectos fueron dispuestos sobre sus respectivas plantas hospederas, en el interior de la cámara de crianza.

El continuo recambio del sustrato vegetal, ha permitido mantener en tiempo la crianza de estos insectos.

b. Crianza de plantas como sustrato alimenticio para insectos.

A fin de contar con el material vegetal adecuado, en forma expedita y libre de pesticidas, que será utilizado como sustrato alimenticio para los insectos plaga, se cultivó plantas de tomate y repollo, desde almácigos a plantas adultas, bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo. Para el cultivo de las plantas hospederas, se crearon períodos de cultivos que van desde los 15 a 20 días.

c. Mantención Ceparios del *Bacillus thuringiensis* (Bt).

El 25 de febrero de 2004, se recibieron las 10 cepas del Bt (LM-1 a LM-10) aportadas por el señor Luis Meza Bassó para los ensayos de este proyecto. Cada una de ellas, es mantenida en el laboratorio de Bio insumos Nativa, en forma de colonias creciendo sobre medio Luria Bertani (LB) a 4 °C, las que son subcultivadas mensualmente. Dado el riesgo de perder alguna cepa, o los plásmidos codificantes de

toxinas Cry, por problemas de contaminación o temperatura, se realizó respaldo de estas, en la forma de liofilizado de esporas y criopreservación en glicerol. Este último, es mantenido a -80°C en la Universidad de Talca.

d. Cultivo del Bt para la obtención de Toxinas Cry.

En esta actividad, se ensayó las condiciones de cultivo del Bt y se establecieron los procedimientos que permiten obtener cristales paraesporales. Para este logro, fue necesaria la habilitación de un espacio físico, que permite mantener una temperatura ambiental adecuada para el buen desarrollo del bacilo, hasta lograr la autólisis celular. Los procedimientos de purificación de esporas y proteínas Cry posteriores han completado esta actividad.

Para evaluar el rango de eficacia insecticida de cada una de las cepas, se realizará un ensayo preliminar. Este consistirá primero en analizar el efecto de dos dosis límites (una alta y una baja), de manera de detectar el piso y techo de las concentraciones a evaluar.

En una segunda etapa, se evaluará la dosis letal 50 (LD50). Se analizarán 5 dosis por cepa (dentro de los rangos evaluados anteriormente), con 10 larvas por tratamiento (repeticiones). Utilizando una balanza analítica para la preparación exacta de las dosis, una cantidad adecuada de extracto Bt se resuspenderá en 25 ml de agua destilada estéril, ajustada a pH 10,5, mezclándose mecánicamente a 37°C , hasta lograr homogeneización total (Thomas y Ellar, 1983).

Debido a los problemas de canibalismo, reportados en algunas larvas neonatas, se utilizó la metodología conocida como bioensayos en hojas (bioassays leaf). Esta consiste en la utilización de discos de hojas jóvenes, correspondientes a los hospederos de cada insecto, como sustrato alimenticio. Discos de hojas de repollo y de lechuga de 5 cm, sirvieron de alimento a larvas de la polilla de la col y gusanos cortadores, respectivamente. Para la polilla del tomate se utilizó un foliolo como sustrato. El tejido vegetal utilizado debe ser fenológicamente uniforme y libre de cualquier plaguicida. Estos fueron colocados en el interior de una placa Petri (6 cm de diámetro).

Cada disco (o foliolo) fue lavado en una solución de Tween 20 al 0,3%, luego lavado en agua destilada (tres veces) y secado en papel absorbente. El material vegetal así tratado, fue sumergido y agitado suavemente por 2 minutos, en una suspensión de extracto Bt, de características y concentraciones determinadas. Una vez seco, sobre una superficie no absorbente, el material vegetal fue transferido al interior de una placa pétri, sobre papel previamente humedecido con agua destilada estéril. En tomate, se colocó un algodón humedecido en el extremo apical del foliolo para controlar su hidratación. Una larva neonata fue depositada sobre el disco vegetal, y constituyó la unidad experimental (Jonson et al., 1991).

Se efectuaron controles utilizando larvas testigos depositadas sobre tejido vegetal humectadas solamente con el vehículo de la solución proteica, agua destilada estéril ajustada a pH 10,5.

Las condiciones ambientales de los ensayos fueron de 25°C , con un fotoperíodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad.

La mortalidad se evaluó cada 24 horas, siendo la duración de cada bioensayo de 144 hrs. Los porcentajes de mortalidad se adecuarán a la fórmula de Abbot (Abbot, 1925) y los valores LD50 (Dosis Letal 50) se obtendrán por análisis Probit (Moermans y Hecke, 1995) utilizando para ello un programa computacional.

Para cada especie de insecto, se elegirá las tres cepas con menor LD50. Estas cepas serán utilizadas en los estudios de compatibilidad con pesticidas.



El diseño experimental será completamente al azar con arreglo factorial de 10X 5 donde los factores son cepas y dosis respectivamente. Cada tratamiento tendrá 10 repeticiones. Los resultados fueron sometidos a un ANDESA y si existieren diferencias significativas, al test de separación de medias de Tukey HSD ($P > 0.05$).

No se utilizaron dietas, por las siguientes razones, primero el costos de estas, la dificultad de manejo y principalmente por el hecho que estas dietas requieren fungicidas y bactericidas, para su elaboración, lo que podría estar alterando el efecto del Bt. Además se cuenta con experiencia en la crianza de estas plagas sobre sustrato natural, lo que es bastante fácil ya que lechuga se encuentra durante todo el año.

1.1 Ensayo de Compatibilidad con pesticidas

El principal objetivo de este ensayo, es analizar la compatibilidad de las tres cepas de *B. thuringiensis* por plaga (que mostraron mayor actividad insecticida) frente a los principales fungicidas y bactericidas usados en las hortalizas. Estos productos por su composición química, podrían eventualmente causar alguna incompatibilidad, o anular su efecto insecticida de Bt. Para este propósito se utilizará algunos de los fungicidas más usados por los agricultores: captan, benomil y mancozeb, además de algún bactericida como oxícloruro de cobre.

Cada ensayo se realizará con larvas sobre discos de hojas o folíolos. Las dosis a utilizar corresponderán a las LD50 determinadas para las cepas Bt en estudio, y en el caso de pesticidas, se usaran las dosis comerciales. Las dosis de ambos productos (Bt y Pesticidas) serán mezclados para luego realizar las aplicaciones por aspersión sobre los discos o folíolos. Cada ensayo contemplará 10 unidades experimentales.

Los controles corresponderán a hojas sumergidas en agua destilada estéril ajustada a pH 10,5, las condiciones de los ensayos serán de 25° C, con un fotoperíodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad.

1.2 Ensayo de efectos sobre enemigos naturales.

Para realizar este ensayo se aplicaran la mejor dosis y cepas seleccionadas de cada una de las plagas. Los insectos a evaluar serán *Apis mellifera* e *Hipodamia* sp, representando los ordenes a los que pertenecen la mayoría de los controladores biológicos. Se realizaran dos ensayos uno por contacto, donde los insectos serán asperjados con la dosis y cepas seleccionadas anteriormente y luego puestos en un hábitat adecuado, sin presencia de las cepas, donde se evaluara su sobrevivencia. El segundo ensayo consistirá en realizar aplicaciones de las cepas sobre el hábitat, con las fuentes de alimento presentes, solución estéril azucarada para abejas y pulgones para chinitas, donde se medirá el efecto por ingestión. Los insectos una vez muertos serán sembrados en placas petri con agar nutriente, para determinar la presencia de las cepas de Bt.

El diseño experimental será completamente al azar, siendo cada tratamiento las cepas a la dosis seleccionada y con 10 repeticiones, por insecto. Los resultados serán sometidos a un ANDESA y si existieren diferencias significativas, al test de separación de medias de Tukey HSD ($P > 0.05$).

Los tratamientos serán aplicación de cada una de las cepas de *Bacillus* seleccionadas y un testigo sin aplicación. Considerándose 3 repeticiones de 10 insectos por tratamiento.



(PCA) y se harán coloraciones con azul de Comassie para observar las células con el cristal bioinsecticida. Cada tratamiento se hará por triplicado, utilizándose un diseño completamente al azar.

4.2. Ensayo de temperatura y pH.

Para medir el efecto del pH y la temperatura se harán las siguientes combinaciones:

- pH 6,5 a 25, 30 y 35°C.
- pH 7,0 a 25, 30 y 35°C
- pH 7,5 a 25, 30 y 35°C.

Se considera pH 7 y 25° C como condiciones control.

Para esto se utilizarán los bio reactores, cada uno de los cuales serán llenado con 500 ml del medio de cultivo, seleccionado del ensayo I e inoculado con 50 ml del inóculo estándar a una concentración de 10^6 esporas/ml. Durante el proceso de fermentación se realizarán 8 muestreos a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 48 horas extrayéndose 2ml de los medios fermentativos para evaluaciones de pH y recuento de células viables. Los recuentos del microbio se harán por duplicado por el método de placa vertida en medio Plate Count Agar (PCA) y se harán coloraciones con azul de Comassie para observar las células con el cristal bioinsecticida. Cada tratamiento se hará por triplicado, utilizando un diseño factorial de 3x3.

4.3. Ensayo de oxigenación.

Utilizando la combinación de los factores antes estudiados, se evaluarán 3 sistemas de oxigenación.

- Sin adición de aire ni agitación (control)
- Adición de H₂O₂ (10 mg/l) cada 3, 6, 12 y 24 hrs.
- Adición de aire esterilizado a 0,5, 1, 1,5 y 2 vol de aire/vol de medio/min

En combinación con dos patrones de agitación de 200 y 800 rpm.

El aire se esterilizará, al hacerlo pasar por una suspensión de NaCl al 30%

Para esto se utilizarán los bio reactores, cada uno de los cuales serán llenado con 500 ml del medio de cultivo, seleccionado del ensayo I e inoculado con 50 ml del inóculo estándar a una concentración de 10^6 esporas/ml. Durante el proceso de fermentación se realizarán 8 muestreos a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 48 horas extrayéndose 2mL de los medios fermentativos para evaluaciones de pH y recuento de células viables. Los recuentos del microbio se harán por duplicado por el método de placa vertida en medio Plate Count Agar (PCA) y se harán coloraciones con azul de Comassie para observar las células con el cristal bio-insecticida. Además se determinará la cantidad de antiespumante necesario para cada velocidad de agitación. Cada tratamiento se hará por triplicado, utilizando un diseño factorial de 2x4x2.

4.4. Optimización producción.

Una vez determinado el mejor conjunto de parámetros de producción, se iniciará un proceso de optimización, de la producción, a través de la disminución controlada de aporte de nutrientes y energía, al sistema productivo buscando al final del proyecto poder generar una cantidad de Bt.

activa. Como una forma de evitar la contaminación de las muestras, todas las operaciones de repique e inoculación se realizarán en cámara de flujo laminar.

Para realizar los estudios de laboratorio, las cepas serán cultivadas en matraces erlenmeyer, en medio de cultivo leche peptonizada, en agitación en agitador orbital. El crecimiento de las cepas se realizará con agitación continua, a 25° C, esto permitirá tener un inóculo estándar para la realización de los ensayos. Todos los trabajos de inoculación se realizarán bajo cámara de flujo laminar.

La producción de bacterias, se realizará en biorreactores del tipo "air lift" de asa interna. Para la construcción de los biorreactores, se emplearán botellas de suero de 1L, las cuales serán cortadas por su parte superior hasta una altura desde 14 cm. Las tapas se fabricarán de un material microporoso, con un diámetro de 10 cm, y tendrán orificios para los dispositivos de salida de CO₂, toma temperatura e ingreso de aire. Una asa interna, hecha de un tubo de vidrio con un diámetro de 3,0 cm y con una altura de 5,5 cm, se encontrará en la parte central del biorreactor adherido con silicona a las paredes a través de soportes. Para el insuflado de aire, se emplearán bombas de aireación para peceras. Este aire se distribuirá en el biorreactor, por medio de una piedra dispersadora, previo paso por unas botellas de vidrio, conteniendo una solución saturada de NaCl al 20% para esterilizar el aire (Mendoza, 1995), modificándose el ingreso de la aireación por medio de un tubo desde la parte superior hasta la parte inferior del biorreactor.

Los biorreactores vacíos serán esterilizados usando luz UV a 30 cm durante 15 minutos, previo tratamiento con hipoclorito de sodio al 20% por 5 minutos.

Para iniciar el cultivo se producirá un preinóculo bacteriano a partir del cepario preexistente. Para ello, se tomará una pequeña cantidad de bacterias, desde las placas petri, y se crecerán en 20 ml de leche peptonizada, durante 24 horas a 28 °C con agitación constante. Este preinóculo será vertido sobre 480 ml de leche peptonizada contenido en el biorreactor.

4.1 Ensayo de medio de cultivo.

Se evaluarán para cada una de las cepas seleccionadas las siguientes mezclas de nutrientes, para determinar el mejor medio de cultivo de Bt.

- Caldo nutriente.
- Medio Lb.
- Medio CIB.
- Medio PMB
- Jugo de tomate KH₂PO₄+ K₂HPO₄+(NH₄)₂SO₄+ CaCl₂ 7H₂O+ MnSO₄
- Jugo de tomate + aceite de pescado.
- Jugo de tomate + aceite de pescado + KH₂PO₄+ K₂HPO₄+(NH₄)₂SO₄+ CaCl₂ 7H₂O+ MnSO₄

Se considera al Agar nutriente, como tratamiento control.

Cada uno de estos medios de cultivo serán colocados en matraces erlenmeyer de 500 ml, en un volumen de 250 ml/ matraz siendo sembrados, con 25 ml del inóculo estándar suspensión de esporas de Bt, a una concentración 10⁶ esporas/ml, esto realizado en cámara de flujo laminar. Manteniéndose los cultivos en agitación, a una temperatura de 25° C. Durante el proceso de fermentación se realizarán 8 muestreos a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 48 horas extrayéndose 2ml de los medios fermentativos para evaluaciones de pH y recuento de células viables. Los recuentos del microbio se harán por duplicado por el método de placa vertida en medio Plate Count Agar



2.- Bioensayo de Terreno: Determinación en condiciones de campo, de la capacidad insecticida de las 3 cepas de *Bacillus thuringiensis* evaluadas por especie, para el control de *Tuta absoluta*, *Agrotis spp* y *Pieris brassicae*

Esta etapa contempla la evaluación de campo de las 3 mejores cepas obtenidas a partir de los bioensayos de laboratorio para cada especie a controlar.

Para el estudio de ensayos de campo, se seleccionará sectores con altos índices de ataque de este grupo de insectos. Los sectores más adecuados corresponden a la zona de San Clemente, reconocida productora de hortalizas, y la zona de Colín, que está entre los mayores productores de tomate bajo plástico u otra que muestre altos índices de ataque de las plagas en cuestión. Los agricultores a seleccionar, serán habituales productores de los cultivos en estudio, ubicados en la séptima región, en zonas con historial de problemas de las plagas, serán convencionales y si existiera la posibilidad en el momento, se realizara otra unidad con un productor orgánico.

Para realizar los tratamientos se considerará el estado fenológico de los cultivos y los insectos. El tratamiento contra gusanos cortadores como la mariposa blanca de la col comenzará junto con la emergencia de las plantas (lechuga y repollo respectivamente). Para tomate, los estados a considerar serán floración y formación de frutos.

Los ensayos de campo serán realizados en cámaras individuales de alimentación. Estas consisten en dos cápsulas cilíndricas plásticas de 10 cm de diámetro, cubiertas en uno de sus extremos con una fina malla metálica, unidas a una pinza metálica que permite fijar la cámara a la lamina foliar sin dañarla físicamente, e impidiendo la salida de las larvas. Esta técnica evita el problema de alterar el tejido y compuestos naturales de la planta, con la consiguiente liberación de sustancias que pueden alterar la conducta del insecto y del ensayo.

Las variedades de hortalizas corresponderán a las mismas utilizadas en los ensayos in vitro. El diseño experimental será de bloques al azar. Para cada cultivo se evaluarán 10 plantas (unidades experimentales) de tamaño y vigor similar. Cada planta tendrá 4 cámaras de alimentación, con una larva cada una (repeticiones). Los parámetros a medir serán mortalidad y área de daño por la larva. Los resultados serán sometidos a un ANDESA y si existieren diferencias significativas, al test de separación de medias de Tukey HSD ($P > 0,05$).

Las plantas serán asperjadas con una suspensión de extracto Bt, utilizando la concentración LD50 determinada en los bioensayos de laboratorio. La aplicación se realizará al atardecer, evitando la exposición solar.

Tratamientos por plaga:

- T1: Testigo absoluto
 - T2: Control positivo: Dipel(R) 2X en dosis comercial
 - T3: Cepa Bt 1
 - T4: Cepa Bt 2
 - T5: Cepa Bt 3
 - T6: Piretroide convencional.
- 5.- Enemigos naturales.

3.- Determinación de los parámetros óptimos de producción de las cepas activas de *B. thuringiensis*, para las plagas en estudio.

Para cumplir con esta actividad, se dispone de 10 cepas nativas de *B. thuringiensis*, aportadas por el doctor Luis Meza Basso de la Universidad de Talca, las cuales mostraron una alta producción de la toxina

suficiente para abastecer 20 has de alguna de las hortalizas, sobre las que se trabaja en el proyecto. Además de realizar una estimación de costos de producción de cada una de las cepas de Bt. Esto se realizaría en los bio reactores air lift, conjugando todos los factores ya estudiados.

La producción de bacterias, se realizará en biorreactores del tipo "air lift" de asa interna. Para la construcción de los biorreactores, se emplearán botellas de suero de 1L, las cuales serán cortadas por su parte superior hasta una altura desde 14 cm. Las tapas se fabricarán de un material microporoso, con un diámetro de 10 cm, y tendrán orificios para los dispositivos de salida de CO₂, toma temperatura e ingreso de aire. Una asa interna, hecha de un tubo de vidrio con un diámetro de 3,0 cm y con una altura de 5,5 cm, se encontrará en la parte central del biorreactor adherido con silicona a las paredes a través de soportes. Para el insuflado de aire, se emplearán bombas de aireación para peceras. Este aire se distribuirá en el biorreactor, por medio de una piedra dispersadora, previo paso por unas botellas de vidrio, conteniendo una solución saturada de NaCl al 20% para esterilizar el aire (Mendoza, 1995), modificándose el ingreso de la aireación por medio de un tubo desde la parte superior hasta la parte inferior del biorreactor. Los biorreactores vacíos serán esterilizados usando luz UV a 30 cm durante 15 minutos, previo tratamiento con hipoclorito de sodio al 20% por 5 minutos.

4.5. Evaluación de sistemas artesanales.

Paralelamente a la producción en bio reactores, se montara el sistema de producción artesanal, utilizado en Cuba, el que consiste en:

En frascos de vidrio de 1 l, se añaden 700 ml de medio de cultivo, con el pH ajustado al valor mejor evaluado, estos frascos se colocan a incubar a la mejor temperatura evaluada en oscuridad.

Para cada tratamiento se realizaran muestreos a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 48 horas extrayéndose 2ml de los medios fermentativos para evaluaciones de pH y recuento de células viables. Los recuentos del microbio se harán por duplicado por el método de placa vertida en medio Plate Count Agar (PCA) y se harán coloraciones con azul de Comassie para observar las células con el cristal bio-insecticida. Una vez detectado el cristal bio insecticida, se elaborara el extracto Bt para cada uno de los sistemas, los que serán evaluados para cada una de las cepas seleccionadas, en sus respectivas plagas

4.6. Almacenamiento del producto activo

Utilizando el mejor conjunto de parámetros de producción, se producirán en los bio reactores 500 ml de cada una de las cepas de Bt, los que se someterán a centrifugación a 2500g por 15 minutos, eliminándose el sobrenadante, dividiéndose en . El precipitado se someterá a los siguientes tratamientos:

- . 50° C
- . 45° C

Con y sin aire forzado, en estufa de secado con aire forzado.
cada una de estas temperaturas por :

- . 12 hrs.
- . 24 hrs.



Después de esta etapa se evaluará la actividad in vitro de dosis de cada una de las cepas, bajo cada uno de los tratamientos, seleccionando el sistema de secado que requiera menor dosis y concentración de las cepas de Bt.

El tratamiento mejor evaluado para cada cepa será sometido al siguiente ensayo factorial.

Factor acarreados

- . Talco.
- . Bentonita.
- . Zeolita.

Factor temperatura de almacenaje

- . 4° C
- . 10° C
- . 25° C

Envase

- . Envase de papel aluminizado.
- . Envase de papel aluminizado envasado al vacío.

Esto con 10 repeticiones por tratamiento.

Trimestralmente, por 16 meses se evaluará, a través de ensayos in vitro, la actividad de cada uno de los tratamientos y las UFC por gr. de cada una de las formulaciones. Los resultados serán sometidos a un ANDESA y si existieren diferencias significativas, al test de separación de medias de Tukey HSD ($P > 0.05$).

5 Actividades del Proyecto:

Objeto Especial N°	Actividad N°	Descripción	Fecha programa	Fecha ejecución	Observaciones
	1.1	Cultivo de plantas hospederas para plagas	Nov/03- Mar/04	Nov/03- Mar/04	Esta labor continuará durante todo el desarrollo del proyecto
	1.2	Recolección de plagas a criar	Nov/03- Mar/04	Mar/04- Mar/04	Actividad finalizada.
	1.3	Crianza de insectos plagas	Ene/04- Jun/04	Mar/04	Se optó por el cultivo directo de larvas sobre sus plantas hospederas, hasta la finalización del proyecto
	1.4	Bio Ensayo Laboratorio	Jun/04	Dic/04 Ene/05 Mar/05	Tuta Agrotis Plutella
	1.5	Bio ensayo compatibilidad	Sep/04	Mar/05	
	2.1	Selección de agricultores	Sep/04	May/05	
	2.2	Bio ensayos de campo	Abril/05	May/05 oct/05	Tomate Plutella



	2.3	Desarrollo Unidades de Validación	Feb/06	Abr/06	
	2.3	Instalación y desarrolló de ensayos de campo	Mar/06	Mar/06	
	3.1				
	3.2	Elaboración de cepario del Bt	Dic/03- Ene/04	Mar/04	Se retrasó por falta de equipamiento (refrigerador) para mantención de cepario en fresco.
	3.3	Producción de cepas de Bt. para bioensayos controlados	Ene/04- Mar/04	May/04	La demora se debió al retraso en la recepción de centrífuga y reactivos para los medios de cultivo.
	3.3	Producción de cepas de Bt. para ensayos	Mar/04		
	3.4	Ensayo I (Medio cultivo)	Jun/04	Nov/04	Terminado
	3.5	Ensayo II (Tº pH)	Sep/04	Nov/04	Terminado
	3.6	Ensayo III (oxigenación)	Dic/04	Nov/04	Terminado
	3.7	Ensayos IV (Optimización)	Abr/06	Ago/06	
	3.8	Ensayos V (Artesanales)	May/06	Sep/06	Terminado
	3.9	Ensayos VI (Almacenaje)	Ene/ 06	Ago/06	Terminado
	4.1	Día de campo	Dic/04	sep/05	
	4.1	Día de campo	Dic/04	sep/05	



Resultados del Proyecto:

Etapa I. Evaluación *in vitro*

6.1 Evaluación de la capacidad insecticida *in vitro* de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. versus una de las cepas comerciales para insectos de tres familias de Lepidopteros, *Tuta absoluta*, *Plutella xylostella* y *Agrotis spp.*

6.1.1 Ensayo I. Para la evaluación de la capacidad insecticida de las cepas nativas de Bt, se utilizó la siguiente metodología:

En esta actividad se evaluó la actividad insecticida de las 11 protoxinas Bt purificadas, contra *Tuta absoluta* y *Plutella xylostella* y *Agrotis spp.*

Para cada ensayo de toxicidad, se preparó 6 dosis de proteína por dieta con 10 repeticiones cada una. Sólo para el caso de las proteínas obtenidas desde Dipel®, se realizaron 6 ensayos independientes, en fechas diferentes, a fin de estimar en forma más precisa la dosis letal 50. Este sirvió de parámetro comparativo, para seleccionar las tres cepas nativas con actividad insecticida igual o superior al producto comercial.

Cada ensayo fue evaluado diariamente hasta completar 7 días. Los resultados fueron representados gráficamente como Número de larvas muertas v/s Horas del iniciado el ensayo, pero para realizar esta evaluación es necesario obtener primero la proteína desde la bacteria por lo que es necesario primero cultivar la bacteria y luego obtener la proteína lo que se realizó siguiendo la metodología descrita a continuación

I. Cultivo del Bt.

Bajo campana de flujo laminar, se toma una azada de colonias Bt desde una placa madre y se inocula un tubo de ensayo con 3 ml de medio Luria Bertani (LB) (10 g/l peptona; 5 g/l extracto de levadura; 10 g/l NaCl) estéril. El preinóculo se mantiene durante la noche a 28 °C, con agitación continua.

Frascos Erlenmeyer, conteniendo 1/4 de su capacidad con medio líquido PMB estéril (10 g/l Leche Peptonizada; 10 g/l Dextrosa; 2 g/l Extracto de levadura; 0,3 g/l MgSO₄·7 H₂O, 0,2 g/l FeSO₄·7 H₂O, 0,2 g/l ZnSO₄·7 H₂O; 0,2 g/l MnSO₄·H₂O), posteriormente se cambió este por el medio GYS ya que posee un periodo más corto que el PMB para lograr la esporulación de la bacteria, son inoculados

asépticamente mediante la adición del inoculo anterior. Los frascos son mantenidos con agitación continua a 28 °C hasta alcanzar la autólisis bacteriana máxima.

El grado de esporulación del cultivo se establece por microscopía óptica. Se realiza un frotis, tomando una pequeña alícuota del cultivo que se deposita sobre un portaobjeto. La muestra es dispersa para formar una fina película, que es fijada al vidrio con la llama del mechero. El frotis es teñido con Azul de Coomasie. Las esporas son refráctiles, mientras que los cristales y células vegetativas se tiñen de azul. El Azul de Coomasie se prepara con 0,3 % Coomasie R-250, 50 % Metanol y 10 % Ácido acético glacial. Mezclar el Coomasie y el Metanol un par de horas y luego adicionar el ácido acético. Filtrar.

El cultivo ya esporulado es centrifugado a 4.000 r.p.m. por 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y el residuo es resuspendido en una solución de lavado (1 M NaCl; 5 mM EDTA) para eliminar proteasas. La suspensión es centrifugada a 4.000 r.p.m. por 10 minutos y se resuspende el residuo con agua destilada estéril, para luego centrifugar nuevamente. Este lavado se repite tres veces. El residuo resultante, conteniendo esporas y proteínas Cry, es guardado a -4 °C hasta su utilización en bioensayos.

II. Obtención de Proteínas Cry

El residuo obtenido en la fase anterior es liofilizado y luego resuspendido en 3 ml de solución de solubilización (50 mM NaCO₃, 10 mM Ditiotreitól; pH 10,5). La suspensión es mantenida por 24 horas con agitación constante a temperatura ambiente, para luego ser centrifugada a 5.000 r.p.m.

El sobrenadante es transferido a un vaso de precipitados y se agrega Sulfato de amonio suficiente para producir una solución al 50 %. Este procedimiento permite precipitar las proteínas en solución. La mezcla es mantenida a 4 °C por 12 horas.

La solución es centrifugada a 10.000 r.p.m.. Se descarta el sobrenadante y el residuo, que contiene a la proteína Bt, es resuspendido en 500 µl de agua estéril pH 10,5. La solución resultante es transferida a una membrana de diálisis, que es mantenida en agitación en agua estéril pH 10,5 durante 3 horas. Se recomienda cambiar el agua al menos tres veces. Terminada la diálisis, la proteína purificada y solubilizada es transferida a un tubo eppendorff estéril. Finalmente, estas muestras son conservadas a -20 °C hasta su utilización en los ensayos posteriores.

La cuantificación de la toxina obtenida se realiza por espectrofotometría, utilizando el método Bradford y lectura a 595 nm. La concentración se expresa en $\mu\text{g/ml}$.

El grado de pureza de la proteína obtenida es evaluada por electroforesis analítica en condiciones denaturantes. La electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida-SDS. La solución del gel separador contiene 12,5 % acrilamida-bisacrilamida 40:1, en un tampón 375 mM Tris-HCl pH 8,8 y 0,4 % SDS. La polimerización se inicia con la adición de 0,03 % de persulfato de amonio y 0,18 % de TEMED. Luego de la polimerización, se prepara una solución de gel espaciador que contiene 6 % de acrilamida-bisacrilamida 40:1, en un tampón 62,55 mM Tris-HCl, pH 6,8 y 0,075 % SDS. Los agentes polimerizantes son adicionados en la misma proporción que al gel separador.

Las muestras a analizar, son mezcladas con un volumen de tampón Laemmli 2X (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4,6 % SDS, 20 % glicerol, 10 % β -mercaptoetanol y 0,1 % azul de bromofenol). La mezcla resultante es calentada a 100 °C por 5 minutos antes de ser aplicada al gel.

El tampón de electroforesis contiene 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina y 0,1 % SDS. La electroforesis es conducida a 50 mA hasta que el frente de migración alcanza el borde inferior del gel. Al concluir la separación, el gel es fijado en una solución al 30 % etanol y 10 % ácido acético durante 30 minutos. Luego, el gel fue teñido durante 1 hora, con una solución que contiene 0,3 % de azul brillante de Coomassie R-250, 50 % metanol y 10 % ácido acético. El gel es luego desteñido para revelar la presencia de bandas proteicas, utilizando la misma solución de fijado. En cada corrida electroforética se analizó, además, una mezcla de proteínas de peso molecular conocido y se estimó el peso molecular aparente de las proteínas de interés.

. Evaluación Actividad Insecticida de las Proteínas Bt.

Se evaluó la actividad insecticida de las toxinas Bt. purificadas y solubilizadas sobre larvas de dos especies de insectos: *Tuta absoluta*, *Agrotis* sp y *Plutelia xylostella*.

En los bioensayos se utilizó 6 dosis de cada una de las toxinas examinadas. Las concentraciones de las toxinas evaluadas fueron las siguientes: 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 y 40.0 $\mu\text{g/ml}$. Para este efecto, se preparó 10 ml de cada solución de toxina, resuspendiendo una alícuota adecuada de toxina en el volumen necesario de agua destilada estéril pH 10,5.

Se tomó hojas de tomate, morfológicamente similares, desde plantas que no han recibido aplicación de plaguicida alguno. Las hojas son lavadas con una solución de Tween 20 al 0,3 % y luego, lavadas en abundante agua destilada estéril y secada entre dos toallas de papel. Las hojas son entonces sumergidas, individualmente, en cada una de las soluciones tóxicas y el conjunto se mantiene con agitación suave por espacio de 1 minuto. Las hojas son extraídas desde las soluciones y secadas a temperatura ambiente sobre una superficie no absorbente. A continuación, se acomodó en el peciolo de cada hoja una mota de algodón humedecido con agua. Posteriormente, la hoja es depositada sobre una placa Petri de 5 cm de diámetro, provista con un círculo de papel filtro húmedo en su interior. El ensayo considera incluir sólo una larva por cada placa Petri y se ensayó 10 insectos por dosis, contemplando, además, un número equivalente de testigos en que la solución de toxina es reemplazada por el vehículo líquido.

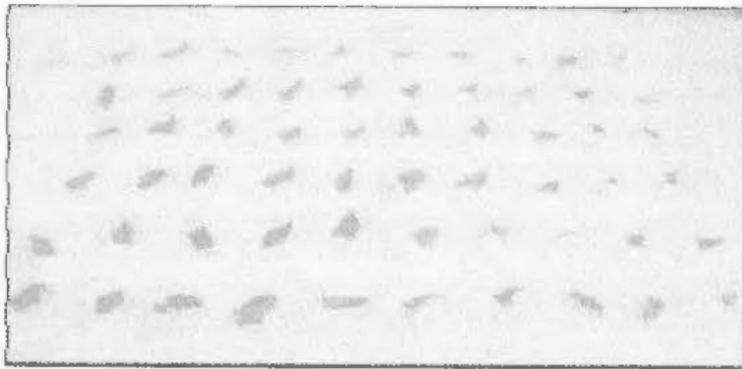


Figura 1 Montaje ensayo in vitro, Bt para evaluar capacidad insecticida sobre Tuta, en folíolos de Tomate.

Al iniciar el ensayo, las larvas, pertenecientes al 2^o estadio, fueron depositadas sobre hojas tratadas con la solución de toxina o en su defecto, el vehículo líquido sin toxina. Los ensayos se prolongaron por 168 horas, manteniendo cada unidad experimental a una temperatura de 25 °C con un fotoperíodo de 16 8 horas luz/oscuridad. Los insectos son monitoreados diariamente para registrar la mortalidad, humedecer el papel filtro y algodón con agua. Los datos de mortalidad fueron registrados diariamente por el total de días contemplados en horas.

Para el caso de larvas de *Agrotis* y *Plutella* el procedimiento es similar, salvo que aquí se trata de círculos de hojas de repollo sumergidos en las soluciones de toxina.

Se obtuvo la curva de mortalidad de larvas *T. absoluta*, *Agrotis* y *Plutella* producidas por DipeL®. Esta fue empleada como punto de comparación y selección de las cepas nativas a evaluar en condiciones de campo (Cuadro 1). El parámetro de comparación es el porcentaje de mortalidad a las 24 horas, con una dosis de 10 µg/ml, que corresponde a la concentración que genere una mortalidad más temprana, diferenciable del testigo.

Tuta absoluta

Cuadro 1. Mortalidad de *Tuta absoluta*, por efecto de DipeL®, expresado en porcentaje, bajo en distintos tiempos a una dosis de 40 µg/ml.

Cepa/horas	24	48	72	96	120	144
DipeL®	8,3%	26,7%	48,3%	67,8%	87,7%	92,6%
PN	90,0%	90,0%	90,0%	90,0%	90,0%	90,0%
66B	0,0%	50,0%	60,0%	60,0%	70,0%	80,0%
72 a	0,0%	0,0%	30,0%	40,0%	50,0%	60,0%
g11g	0,0%	0,0%	0,0% d	40,0%	70,0%	90,0%
104a	0,0%	0,0%	0,0%	40,0%	70,0%	90,0%
114	0,0%	0,0%	20,0%	50,0%	90,0%	90,0%

Dados los resultados mostrados en Cuadro 1, podemos ver que la única cepa que supera a DipeL® es 66 b, capaz de matar el doble que DipeL® a las 48 hrs. Del resto, las únicas con un potencial similar son la 114, capaz lograr mortalidades similares a las de DipeL® a las 96 horas de iniciado el ensayo, y la cepa PN, que no pertenece a la colección de la Universidad de Talca. Es la única que supero a DipeL®, logrando un 90% de mortalidad a las 24 horas. Por lo tanto, estas tres cepas son las seleccionadas para el ensayo *in vivo*.



Agrotis sp

En el ensayo de *Agrotis*, se obtuvieron mortalidades extremadamente bajas (Cuadro 2)

Cuadro 2. Mortalidad de *Agrotis*, por efecto de DIPEL® expresado en porcentaje, bajo distintas dosis y en distintos tiempos.

Dosis ($\mu\text{g/ml}$)/horas	24	48	72	96	120	144	168
1,25 $\mu\text{g/ml}$	0	0,0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
2,5 $\mu\text{g/ml}$	0	6,7	6,7	10,0	13,3	13,3	13,3
5 $\mu\text{g/ml}$	0	3,3	10,0	16,7	20,0	20,0	20,0
10 $\mu\text{g/ml}$	0	10,0	13,3	16,7	20,0	20,0	20,0
20 $\mu\text{g/ml}$	0	10,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
40 $\mu\text{g/ml}$	0	6,7	13,3	20,0	23,3	23,3	23,3
control	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Debido a las bajas mortalidades obtenidas en el primer ensayo este se realizó nuevamente, durante el mes de febrero de 2005, con dosis mayores a las utilizadas para *Tuta*, como se puede observar en el cuadro 3 con las dosis evaluadas no se alcanza a obtener un LD50 durante el tiempo de evaluación

Cuadro 3. Mortalidad de *Agrotis*, por efecto de DIPEL(R), expresado en porcentaje, bajo distintas dosis y en distintos tiempos.

Dosis ($\mu\text{g/ml}$)/horas	24	48	72	96	120	144	168
10 $\mu\text{g/ml}$	0	0	0	0	0	0	0
20 $\mu\text{g/ml}$	0	0	0	5	10	10	10
40 $\mu\text{g/ml}$	0	0	0	10	20	30	30
80 $\mu\text{g/ml}$	0	0	0	15	25	45	45
Control	0	0	0	0	0	0	0

Debido a estos resultados se descartó el seguir trabajando con *Agrotis*, ya que debido a que el LD50 era tan alto no era posible obtener la proteína necesaria para realizar estos ensayos.

Plutella xylostella

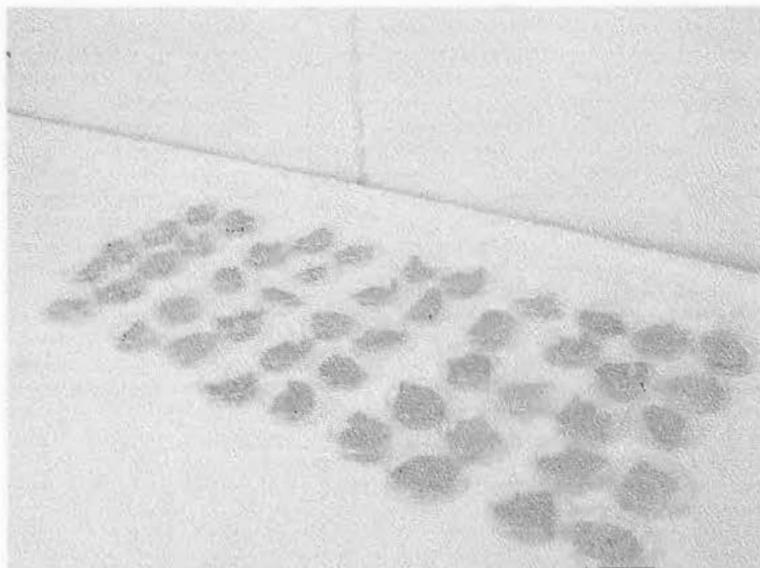


Figura 2. Montaje ensayo *in vivo* *Plutella xylostella*, sobre hojas de repollo

Cuadro 4. Mortalidad de *Plutella*, por efecto de Dipel®, expresado en porcentaje, bajo distintas dosis y en distintos tiempos.

Dosis ($\mu\text{g/ml}$)/horas	24	48	72	96	120	144	168
1,25 $\mu\text{g/ml}$	0	0	5	20	40	45	45
2,5 $\mu\text{g/ml}$	0	10	10	15	30	30	45
5 $\mu\text{g/ml}$	0	5	20	25	35	50	50
10 $\mu\text{g/ml}$	0	15	30	40	40	60	65
20 $\mu\text{g/ml}$	0	25	35	35	50	60	70
40 $\mu\text{g/ml}$	0	15	25	40	45	65	75
Control	0	0	0	0	0	0	0

Como se aprecia en el cuadro 4 la mortalidad de *Plutella xylostella* es de un 75 % con la dosis máxima, menor que la obtenida para *Tuta absoluta* considerando la misma dosis (90%) pero mayor que la obtenida para *Agrotis sp* (30 %), de esta mortalidad debe considerarse que un porcentaje corresponde a larvas a las que Dipel® indujo a pupar, las cuales no fueron individuos viables.



Cuadro 5. Mortalidad de *Plutella* por efecto de cepas nativas, expresado en porcentaje, en distintos tiempos a una dosis de 2.5 µg/ml.

Cepa / horas	24	48	72	96	120	144	168
Dipel®	0	10	10	15	30	30	45
104a	0	0	30	60	60	75	85
114	0	30	45	60	75	75	75
Paso Nevado	0	15	30	85	85	85	85
Control	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 6. Mortalidad de *Plutella* por efecto de cepas nativas, expresado en porcentaje, en distintos tiempos a una dosis de 10.0 µg/ml.

Cepa / horas	24	48	72	96	120	144	168
Dipel®	0	15	30	40	40	60	65
104a	0	15	75	100	100	100	100
114	0	15	45	75	85	100	100
Paso Nevado	0	30	45	75	100	100	100
Control	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 7 Mortalidad de *Plutella* por efecto de cepas nativas, expresado en porcentaje, en distintos tiempos a una dosis de 40.0 µg/ml

Cepa / horas	24	48	72	96	120	144	168
Dipel®	0	15	25	40	45	65	75
104a	0	15	75	100	100	100	100
114	0	45	45	85	100	100	100
Paso Nevado	0	30	75	100	100	100	100
Control	0	0	0	0	0	0	0

En los cuadros 5, 6 y 7 podemos observar que en todas las dosis las cepas nativas superan a Dipel® además de que es una mortalidad efectiva no se observó el mismo efecto que con Dipel® el cual inducía a las larvas a entrar en estado de pupa, a pesar de que todas las cepas consiguen eventualmente un 100 % de mortalidad de las larvas la cepa 104 a lo consigue a las 96 horas con una dosis de 10 µg/ml, la cepa Paso nevado lo consigue a las 120 horas con la misma dosis y la 114 a las 144 horas. Esta diferencia disminuye con la dosis mayor de 40 µg/ml donde las cepas 104 a y Paso Nevado logran un 100% de mortalidad a las 96 horas mientras que la cepa 114 lo hace a las 120 hrs. La cepa nativa más efectiva para *Plutella xylostella* sería la cepa 104 a seguida de la cepa Paso Nevado, confirmandose los resultados parciales obtenidos en el ensayo *in vivo* para *Tuta absoluta* de que estas son las cepas más prometedoras

6.2 Etapa II: Evaluación *in vivo*

6.2.1 Evaluación *in vivo* de la capacidad insecticida de las cepas de *Bt.* efectivas en cultivos de tomate, infestadas con *Tuta absoluta*

Se trata de un ensayo *in vivo*, que pretende valorar la eficiencia insecticida de tres cepas del *Bacillus thuringiensis* (Bt), utilizándose para este efecto, las proteínas y esporas producidas por cada cepa cultivada. El objetivo es, entonces, comparar el nivel de daño en plantas de tomate, tratadas o no con cepas del Bt.

Las cepas Bt utilizadas, son aquellas tres, que en ensayos controlados de laboratorio, han mostrado una eficiencia insecticida, igual o superior a la mostrada por la cepa comercial *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Dipel®).



Figura 3. Exterior Túnel con Plantas.



Figura 4. Interior Túnel, infección foliolos

Los ensayos se realizaron en las dependencias de Bio Insumos Nativa, sobre plantas de Tomate var. Presto, que fueron cultivadas en bolsas con 4 litros de sustrato (turba:arena compost; 1:1:1). Como organismos blanco se utilizaron larvas de la polilla del tomate (*Tuta absoluta*). El formulado comercial Dipel® Fue utilizado como parámetro comparativo, y plantas sin tratar, como control. Las plantas fueron dispuestas completamente al azar dentro de un túnel con malla antiafido y se realizó la infección previa de las plantas liberando adultos de la polilla del tomate. El ensayo inicio con plantas a las cuales se elimino todo resto de hoja dañada. Cada tratamiento consta de 6 repeticiones, cada repetición consta de una planta, que fueron asperjadas con 30 ml de la suspensión a evaluar, a una concentración de 30 µg/ml. El procedimiento se evaluó a partir del tercer día de la aplicación hasta fin del cultivo. Las evaluaciones comprendieron porcentaje de foliolos con daño de Tuta, número de larvas presentes y severidad de los daños, expresados como área de lesión.

En el ensayo fue realizado durante los meses de Abril- Mayo de 2005, Se trata de un ensayo *in vivo*, en que se pretendía valorar la eficiencia insecticida de tres cepas del *Bacillus thuringiensis* (Bt),

utilizándose para este efecto, las proteínas y esporas producidas por cada cepa cultivada. El objetivo es, entonces, comparar el nivel de daño en plantas de tomate, tratadas o no con cepas de Bt.

Las cepas Bt utilizadas fueron aquellas tres, que en ensayos controlados de laboratorio, han mostrado una eficiencia insecticida, igual o superior a la mostrada por la cepa comercial *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Dipel®).

Los tratamientos fueron:

T1 = Dipel (HD 1)

T2 = Cepa 114

T3 = Cepa 104 a

T4 = Cepa PN

T5 = Control sin aplicación



Figura 5. Diferencia grado de daño entre el testigo y planta tratada con cepa PN

En la evaluación de número de daños no existió ninguna diferencia estadística entre los distintos tratamientos (Gráfico 1), lo mismo sucedió con el número de larvas sobrevivientes, pero aquí se puede apreciar tendencia (ver gráfico 2), que la cepa PN si el ensayo se proyecta en el tiempo tendría, exponencialmente cada vez una población menor por lo que la diferencia con las otras cepas incluida Dipel® aumentaría, lo que nos indicaría que serían necesarias un menor número de aplicaciones del producto.

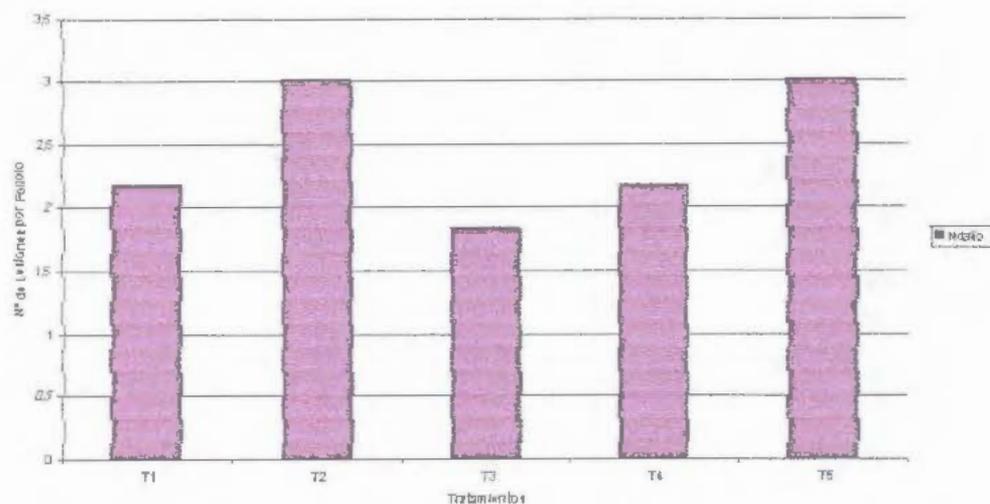


Gráfico 1. Efecto de las aplicaciones sobre el número de daños. No se aprecia diferencia estadística significativa entre los distintos tratamientos

Larvas/foliolo

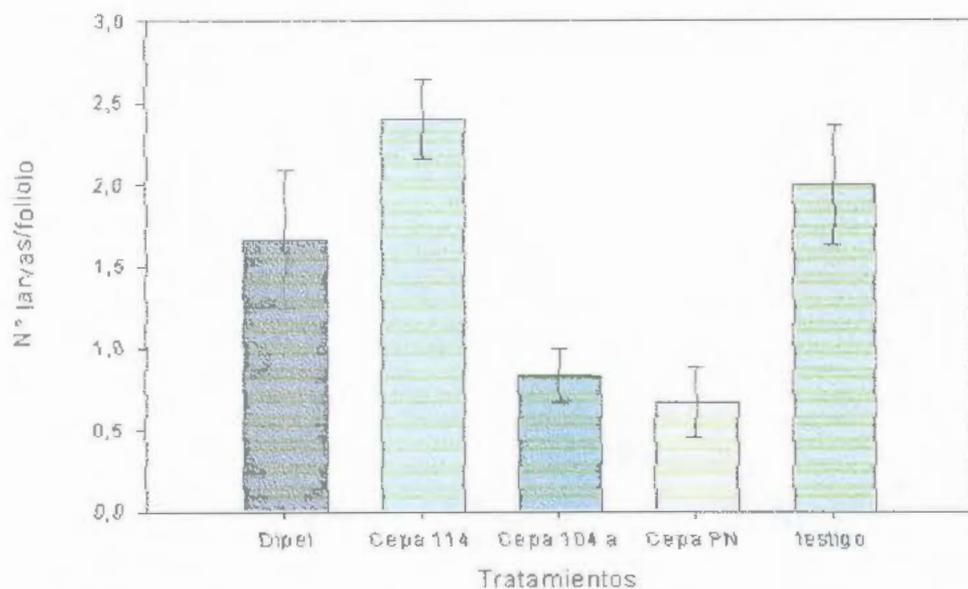


Gráfico 2. Efecto de las aplicaciones sobre el número de larvas sobrevivientes. No se aprecia diferencia estadística significativa entre los distintos tratamientos

Como se aprecia en el gráfico 3, existe una diferencia entre el testigo y los tratamientos, aunque todos tienen un efecto sobre el área de daño, la que presenta una mejor perspectiva para ser utilizada en

un ensayo de campo es la cepa PN, ya que como se dijo anteriormente, esta también presenta una menor sobrevivencia de larvas

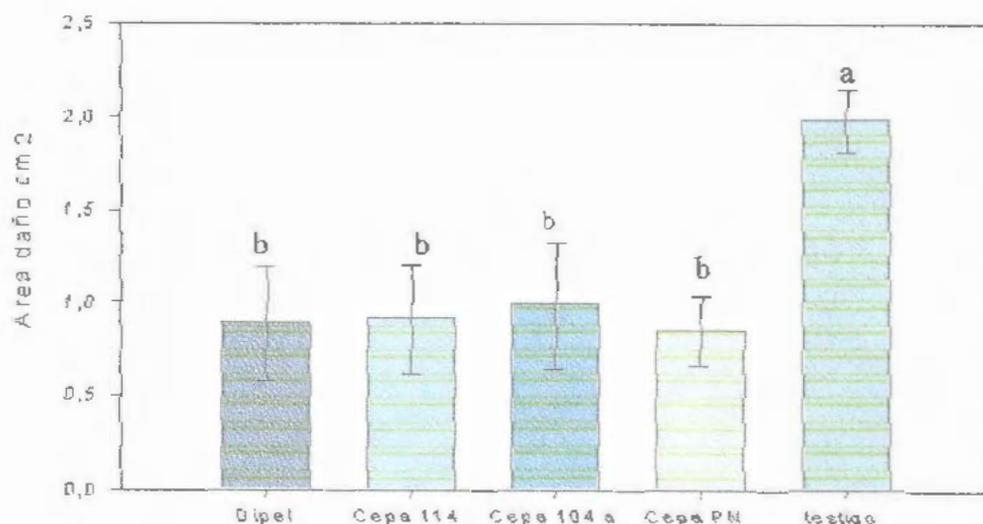


Gráfico 3. Efecto de las aplicaciones sobre el área de daño, mismas letra indica que no existe diferencia estadística significativa.

6.3.2 Evaluación *in vivo* de la capacidad insecticida de las cepas de *Bt* efectivas en cultivos de repollo infestadas con *Plutella xylostella*.

El Procedimiento fue idéntico al utilizado en el ensayo para *Tuta absoluta* en plantas de tomate, utilizando plantas de repollo como planta hospedera y realizando una infección previa con *Plutella xylostella*

Los tratamientos fueron:

T1 = Dipel® (HD 1) ;

T2 = Cepa 114 ;

T3 = Cepa 104 a

T4 = Cepa PN,

T5 = Control sin aplicación

En este ensayo se pretendía evaluar Severidad de la infección, Area Dañada y mortalidad, esta ultima fue imposible de medir ya que esta larva a diferencia de tuta esta sobre la hoja y es imposible distinguir a que tratamiento podría corresponder cada larva, ya que caen al suelo, si pudimos observar que existe una diferencia en la severidad de ataque observada, obteniéndose los mejores resultados en la cepa 114.

siendo además concordante con que esta cepa fue la que tuvo el menor área dañada, aunque no existe una gran diferencia entre las cepas si se observa una diferencia contra el testigo absoluto.

Cuadro Nº 8 Efecto de las distintas cepas sobre severidad y Área dañada

Tratamiento	Severidad	Área Dañada cm ²
T1: Dipel	1.5 c	0.70 ab
T2: Cepa Paso Nevado	1.0 abc	0.43 a
T3: Cepa 114	0.33 a	0.183 a
T4: Cepa 104 a	0.5 ab	0.167 a
T5: Control	1.0 abc	0.45 a
T6: Testigo	1.5 c	1.15 b

Misma letra no existe diferencia estadística significativa(tukey)

6.3 Etapa III: Ensayos en campo.

6.3.1 Evaluación de la capacidad insecticida de las cepas de *Bt.* efectivas en cultivos de tomate, para el control de *Tuta absoluta*.

Se trata de un ensayo *de campo*, que pretende valorar la eficiencia insecticida de tres cepas del *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) en condiciones de campo, utilizándose para este efecto, las proteínas y esporas producidas por cada cepa cultivada. El objetivo es, entonces, comparar el nivel de daño en plantas de repollo, tratadas o no con cepas del *Bt*.

Las cepas *Bt* que se utilizaron, son aquellas tres, que en ensayos controlados de laboratorio, han mostrado una eficiencia insecticida, igual o superior a la mostrada por la cepa comercial *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Dipel®).

Cuadro Nº 9 Efecto de las distintas cepas sobre Mortalidad, Área Dañada y severidad en tomate

Tratamiento	Área Dañada	Severidad	Mortalidad
T1: Dipel	5.383 a	3.5 a	2.00 b
T2: Testigo	9.167 ab	3.833 ab	0.667 a
T3: Cepa Paso Nevado	16.500 b	4.833 b	2.333 b
T4: Cepa 114	10.583 ab	4.167 ab	1.833 ab
T5: Cepa 104 a	15.083 b	4.0 ab	2.00 b
T6: Mezcla P.N. + Bs.	14.667 b	4.0 ab	1.667 ab

Misma letra no existe diferencia estadística significativa(tukey)

Según se puede observar en el cuadro Nº 9 los mejores resultados son los obtenidos por Dipel, seguidos por la cepa 114, estos resultados fueron obtenidos en un cultivo que se encontraba con un muy alta infección de tuta y en etapa senescente de la planta por lo que está fueron repetidos en las zonas de Colín y Quillota.

Ensayo Colín

Predio Sr. Juan Carlos Villacura, se consideraron dos tratamientos aplicación de Bt y Tratamiento del huerto, una nave como unidad experimental, se consideraron tres repeticiones por tratamiento,



Figura 6. Aplicación de Bt en Plantas de Tomate, Ensayo Predio Sr. Juan Carlos Villacura

En este ensayo se pudo apreciar una disminución en la presencia de larvas por foliolo, con la consiguiente disminución en el área dañada. Ver gráfico 4

Larvas/Foliolo

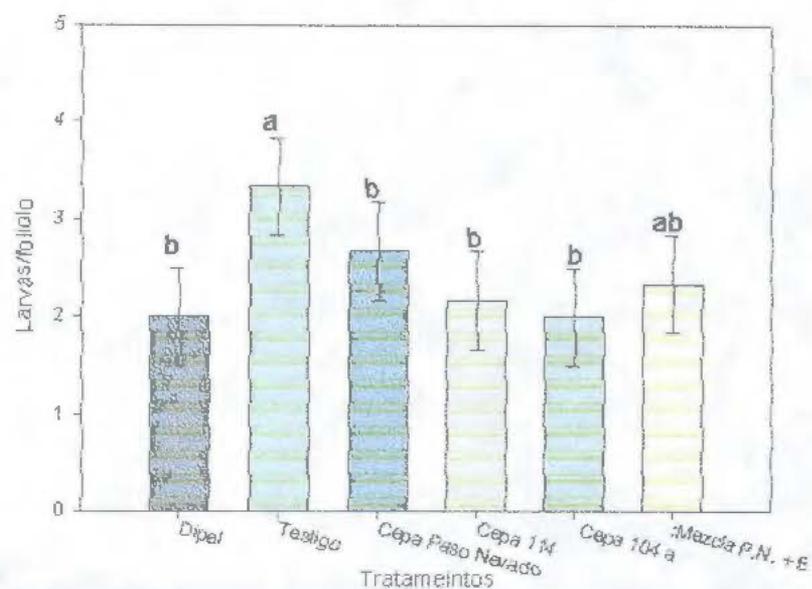


Gráfico 4 efecto de los distintos tratamientos de larvas vivas de *Tuta absoluta* por foliolo en plantas de tomate

Ensayo Quillota

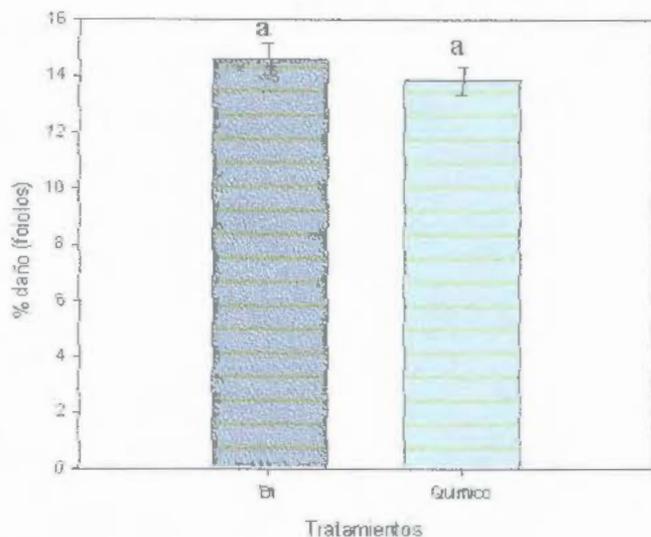
Predio Agrotom Ltda., se consideraron dos tratamientos Bt y tratamiento del huerto, con dos naves por repetición y tres repeticiones por tratamiento, evaluándose el número de racimos por planta, el número de frutos por racimo, y la presencia o ausencia del insecto por planta, tanto en su estado adulto como en el larvario, que es el que produce el daño.

Aunque estadísticamente no se observó diferencia para la presencia de daño por polilla (gráfico 5), si hubo diferencia en la presencia de larvas por planta (gráfico 6) no encontrándose larvas vivas en las plantas tratadas con Bt, así mismo en las plantas tratadas con Bt pudo observarse un mayor número de racimos por planta (gráfico 7) y frutos por Racimo (gráfico 8)



Figura 7. Vista parcial del ensayo, daño provocado por *Tuta* en tratamiento huerto, daño provocado por *Tuta* en Tratamiento Bt

Daño en Foliolos



Larvas Vivas/Planta

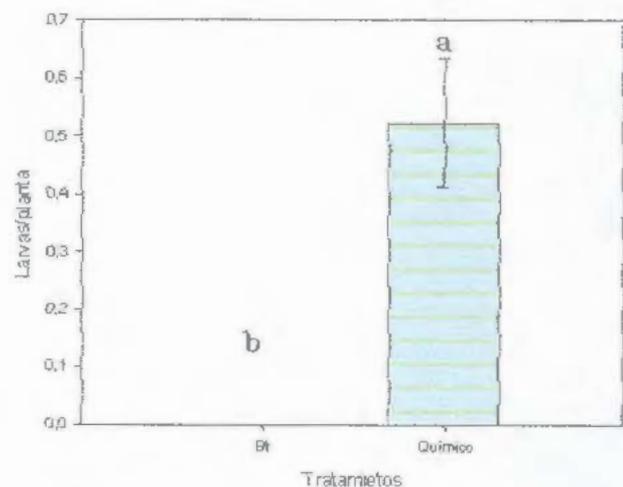




Gráfico 5 Efecto sobre la presencia de Daño por sobre Polilla del tomate

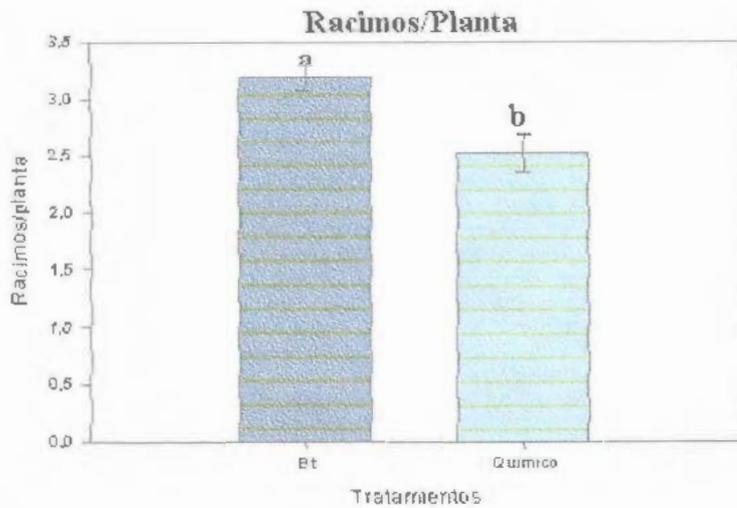


Gráfico 7 efecto de la aplicación de *Bacillus thuringiensis* en el número de racimos por planta en tomates

Gráfico 6 Efecto de los distintos tratamientos la presencia de larvas por planta

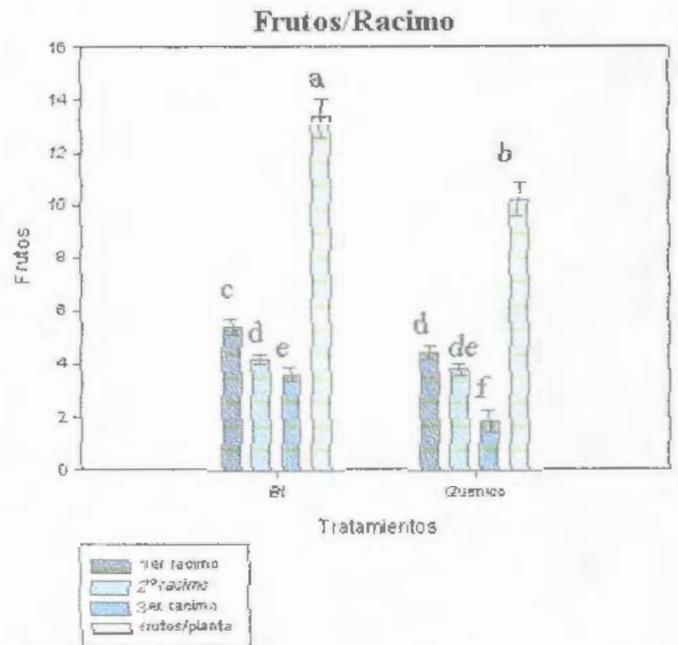


Gráfico 8 Efecto de la aplicación de Bt sobre el número de frutos por racimo

6.3.2 Evaluación de la capacidad insecticida de las cepas de *Bt.* efectivas en cultivos de repollo para el control de *Plutella xylostella*.

Se trata de un ensayo *de campo*, que pretende valorar la eficiencia insecticida de tres cepas del *Bacillus thuringiensis* (Bt) en condiciones de campo, utilizándose para este efecto, las proteínas y esporas producidas por cada cepa cultivada. El objetivo es, entonces, comparar el nivel de daño en plantas de repollo, tratadas o no con cepas del Bt.

Las cepas Bt que se utilizaron, son aquellas tres, que en ensayos controlados de laboratorio, han mostrado una eficiencia insecticida, igual o superior a la mostrada por la cepa comercial *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Dipek®).

Se utilizó un diseño de bloques al azar, el ensayo constó de seis tratamientos cada uno con tres repeticiones, cada bloque consistió de tres plantas. Además de una hilera para cada tratamiento.

El ensayo se llevó a cabo en la localidad de Maule, en un campo con un alto grado de infestación por *Plutella*, tanto que el agricultor dejó el cultivo abandonado.

Los tratamientos fueron

T1: Cepa Paso Nevado

T2: Mezcla 50:50 Cepas Paso Nevado y cepa 114

T3: Cepa 114

T4: Control Químico, Tamaron®

T5: Control Absoluto

Cuadro Nº 10 efecto de los distintos Tratamientos sobre Área Dañada y Numero de lesiones.

Tratamiento	Área Dañada(mm ²)	Nº de Lesiones
T1: Cepa Paso Nevado	1579 ab	29,667 ab
T2: Mezcla cepas	1521,667 ab	22,667 a
T3: Cepa 114	1777 ab	34 b
T4: Control Químico	1120 a	25 ab
T5: Control Absoluto	1662,333 ab	23,667 a
T6: Bs	1817,667 b	28 ab

Como se puede ver en el cuadro anterior y tal como era de esperarse los mejores resultados fueron los obtenidos con el control químico, pero no existe una diferencia estadística apreciable con los resultados obtenidos tanto por las cepas por separado como de su mezcla, si se observa una diferencia con el control absoluto al cual no se le aplicó ningún producto.

El diseño experimental correspondió a Bloques completos al azar, con cinco repeticiones por tratamiento. El ensayo se estableció en el mes de mayo del presente año (Foto 8), la variedad elegida correspondió a Magnum. La parcela experimental consistió en nueve hileras de 14 metros cada una, sembradas a dos semillas por golpe y a doble hilera, regadas con cintas de riego y de acuerdo a las prácticas culturales usuales en la zona.



Figura 8 Vista Parcial del ensayo Figura 9 Larva de *Spodoptera* sp.

Aproximadamente un mes después de sembrar, se observó un ataque natural de larvas del gusano cogollero (*Spodoptera* sp.). Esta plaga atacó hojas y tallos de las plantas, siendo estos últimos los más atacados y dañados llegando a caer gran número de estas (40-45% del total de plantas). El ataque fue intenso por lo menos dos semanas hasta que se aplicó *Bacillus thuringiensis* como cebo. La aplicación se realizó el 13 de junio del presente, por la tarde, considerando el hábito nocturno de estos lepidópteros. La preparación consistió en una mezcla de 20 g de *Bacillus thuringiensis*, 500 g de azúcar y 500 g de aserrín, a esta mezcla se le adicionó un poco de agua y se añadió en el cuello de todas las plantas.



Figura 10 Planta con daño causado por Larvas de *Spodoptera* sp.



Figura 11 Preparación del cebo

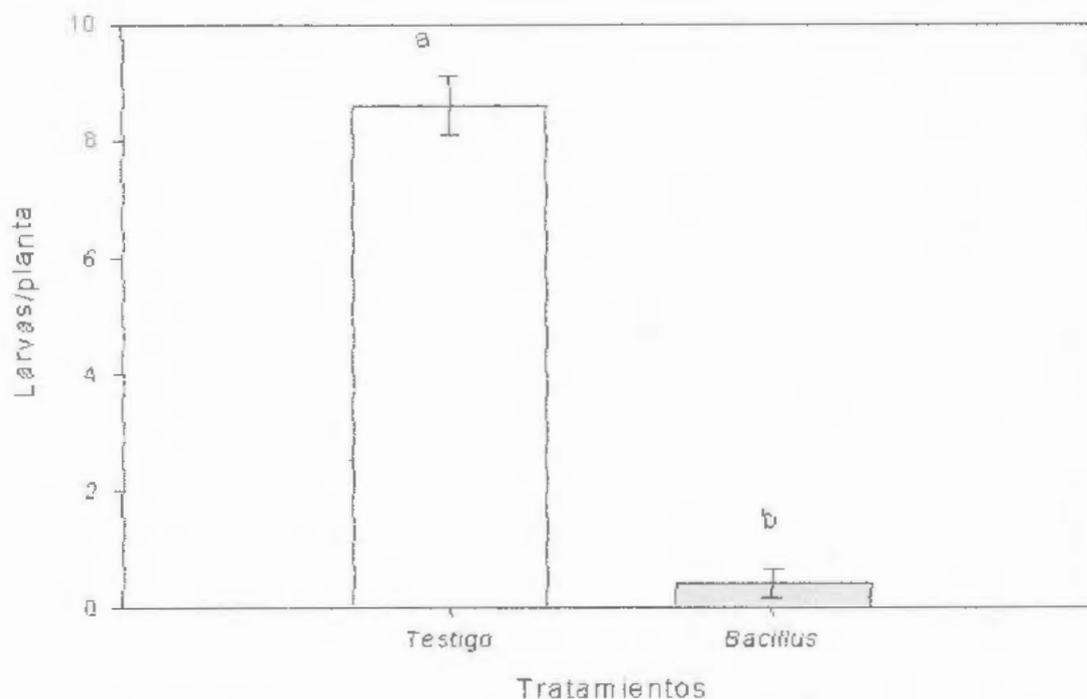


Grafico 10 Efecto de Bt sobre el numero de larvas por Planta misma letra indica no existe diferencia estadística significativa.

Después de 7 días, se evaluó el ataque de *Spodoptera sp.* en los tallos, verificándose una disminución de 50% en el daños en las plantas (Foto10). Además, se comprobó la presencia de larvas vivas, tanto en el cebo (Foto 11), así como en el suelo.

Evaluaciones posteriores permitieron verificar una reducción del daño en un 95-100 %. Posterior a la evaluación, se verificó la erradicación total de la plaga en el cultivo. No se verificó reinfestación ni ataque de la plaga hasta el final del cultivo.

Conclusión: La aplicación de la formulación en base a *Bacillus thuringiensis*, aplicado como cebo tuvo una gran eficacia en contra de *Spodoptera sp.* en ese sentido bastó solo una única aplicación para controlar a la plaga durante todo el cultivo, además su aplicación fue rápida, fácil y no interfirió con otras prácticas de manejo del cultivo.

Responsables de la información: Srta. Evelyn Cajias, Srta. Francisca Estefane y Sr. German F. Sepúlveda Chavera. Fac. Cs. Agronómicas, Universidad de Tarapacá

6.4 Etapa IV: Desarrollo sistema de producción y transferencia

6.4.1 Ensayo II. . Temperatura y pH

Para medir el efecto del pH y la temperatura, se realizó un ensayo completamente al azar con arreglo factorial 3 x 3, donde los factores fueron tres temperaturas a tres valores de pH inicial, que fueron los siguientes:

- pH 6,5 a 28, 24 y 20°C
- pH 7,0 a 28, 24 y 20°C
- pH 7,5 a 28, 24 y 20°C

Se considera pH 7,0 y 25° C como condiciones control.

Se utilizó matraces erlenmeyer de 200 ml, con 50 ml de medio PMB, que fueron inoculados con una suspensión de esporas del Bt a una concentración de 10^6 esporas/ml. Los matraces se mantuvieron con agitación constante a 300 r p m., en cada una de las temperaturas ya mencionadas.

Transcurridos 15 días, tiempo estándar para la formación de esporas y cristales de endotoxinas, se evaluó la producción de proteína Cry y biomasa en cada uno de los tratamientos, mediante las metodologías descritas en anteriormente. Cada tratamiento se realizó con 5 repeticiones, y se utilizó la cepa 104a, que es la más difícil de cultivar.

Al evaluar los parámetros de pH y temperatura, se aprecia que los mayores niveles poblacionales se obtienen a una temperatura de 28 °C y con pH 6,5 (Cuadro 11). En cuanto a la producción de endotoxina, se apreció los mismos resultados, pero sin ser estadísticamente significativos.

Cuadro 11: Efecto de la temperatura y pH en el cultivo de la cepa Bt 104a

pH	°C	UFC/ml	Proteína (µg/ml)
6.5	28	8.43×10^{11} a	32.88
6.5	24	3.75×10^{11} ab	24.86
6.5	20	1.12×10^{10} b	36.06
7.0	28	1.03×10^{10} b	34.49
7.0	24	1.75×10^{10} b	34.29
7.0	20	2.03×10^{11} b	32.16
7.5	28	6.60×10^{10} b	38.16
7.5	24	7.35×10^{10} b	28.65
7.5	20	1.01×10^{10} b	30.23

6.5.2 Ensayos III: Oxigenación

Utilizando los resultados de la combinación de factores antes estudiados, se evaluó los sistemas de oxigenación siguientes:

- Sin adición de aire ni agitación (control)
- Agitación a 250 r.p.m.
- Agitación a 300 r.p.m.
- Agitación a 350 r.p.m.

El montaje y evaluación de este ensayo, es el mismo descrito para aquel de temperatura y pH.

En cuanto al ensayo de oxigenación, se trabajó a una temperatura de 28 °C con un pH inicial de 6.5, lográndose la mayor producción con 300 r.p.m, ya que con 350 r.p.m. se generaba un exceso de espuma.

Cuadro 12, efecto del nivel de oxigenación sobre la población y proteína obtenida

R.P.M.	UFC/ml	Proteína (µg/ml)
0	3.43x10 ⁸ c	0.23 c
250	3.75x10 ¹¹ ab	28.66 b
300	9.12x10 ¹¹ a	37.16 a
350	1.03x10 ¹⁰ b	27.66 b

. Evaluación de Medios de Cultivo Alternativos.

Tomando como base la formulación del medio de leche peptonizada (PMB), se preparó seis nuevos medios, en los que se reemplaza las fuente de carbohidratos y aminoácidos (dextrosa y leche peptonizada) por fuentes homólogas, de fácil adquisición y bajo valor económico. La concentración de sales original permanece sin alteración, mientras que la de extracto de levadura varía entre 0 y 10 g/l. Los formulados son los siguientes:

Medio	Glucosa *	Extracto de Levadura	Harina Pescado
M1	10	10	10
M2	10	0	10
M3	10	0	5
M4	5	10	10
M5	5	0	10
M6	5	0	5
MPB			

(*) Glucosa de uso doméstico



Cada ensayo contempló el cultivo de dos cepas del Bt por medio. Estas cepas se caracterizan por presentar un reducido tiempo de cultivo para alcanzar la fase esporulante. El medio PMB es utilizado como patrón de comparación.

Frascos de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio de cultivo, se inoculan con la cepa del Bt a evaluar y se mantienen con agitación constante a 28 °C. El desarrollo del cultivo es evaluado a los 3, 5 y 7 días. Bajo campana de flujo laminar se toma 10 µl del cultivo, y se extiende sobre un portaobjeto. La muestra es fijada, teñida con azul de coomasie y observada al microscopio óptico. Los parámetros a evaluar son abundancia bacteriana relativa y estado de desarrollo (fase vegetativa o esporulante). El ensayo finaliza al detectarse presencia de proteínas Cry en el medio PMB y se procede a cuantificar la biomasa y proteínas Cry producida en cada tratamiento.

La biomasa producida en cada medio, se efectuó por conteo de Unidades Formadoras de Colonias (CFU) (esporas). Para esto, 1 ml del medio de cultivo es diluido serialmente en 100 ml de agua destilada, hasta obtener una dilución 10^{-6} . 100 µl de esta dilución son sembrados en una placa con medio sólido LB, la que es mantenida a 28 °C durante 18 horas. Después de este tiempo se realiza recuento de colonias bacterianas. La cuantificación de proteínas Cry se realizó utilizando la metodología descrita anteriormente.

Las nuevas formulaciones no permitieron obtener resultados óptimos, comparables a los obtenidos con el medio PMB. En general, sólo se obtuvo un desarrollo escaso de células bacterianas, que se extendió más allá del requerido para obtener lisis en el medio PMB. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes. Problemas de disponibilidad de agitador orbital impidieron la continuación del ensayo.



6.4.3 Evaluación de sustratos inertes y forma de secado para almacenaje y formulación

Basándonos en la experiencia dada por el Trabajo con las cepas biocontroladoras de Bacterias fitopatógenas de *Bacillus* spp. Se decidió seguir el método de secado por capas con el que se lograron para Bt niveles de eficiencia similares. Es decir cercanos al 95%(Cuadro 13), esto por un periodo de 12 meses. Utilizando zeolita como medio acarreador

Cuadro 13 Porcentaje de supervivencia y actividad de *Bacillus* spp., bajo distintos sistemas de secado después de 12 meses de almacenaje.

Cepa	Secado	% UFC/gr.	% Actividad
Mallerauco	Cámara	14.0% a	65.9% b
	Horno	8.0% a	49.0% a
	Horno en capas	95.0% b	98.0% c
Viñun	Cámara	11.0% a	76.6% a
	Horno	9.0% a	54.3% a
	Horno en capas	96.0% b	100.0% b
Antumavida	Cámara	14.3% a	60.2% b
	Horno	9.7% a	49.0% a
	Horno en capas	95.0% b	98.0% c
Maguellines	Cámara	12.3% a	42.0% a
	Horno	10.3% a	60.2% b
	Horno en capas	94.0% b	97.0% c
Maguellines 2	Cámara	8.3% a	42.0% b
	Horno	8.3% a	61.1% b
	Horno en capas	92.0% b	97.0% a
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Horno en Capas	90.0%b	96.1% a

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ($P < 0,05$).

6 Fichas Técnicas y Análisis Económico:

- Fichas técnicas y de costos del o los cultivos, rubros, especies animales o tecnologías que se desarrolló en el proyecto (según corresponda a la naturaleza del proyecto).

Se desarrollo la siguiente ficha técnica para uso de *Bacillus thuringiensis*:

Cuadro 15. Recomendaciones de uso de *Bacillus thuringiensis*. para el control de insectos en cultivos agrícolas.

Cultivo	Plaga	Dosis Recomendada	Recomendación de Aplicación	Frecuencia de Aplicación
Tomate	Polilla del Tomate (<i>Tuta absoluta</i>)	5-7 grs/lt	Aplicar en las horas con menor radiación solar, con buen <i>mojamiento foliar</i> , la dosis dependerá del grado de ataque de la planta, en la primera etapa aplicar la dosis más baja	Cada 7 días
	Mosquita Blanca de Invernadero (<i>Trialeurodes vaporariorum</i>)	5-7 grs/lt	Aplicar en las horas con menor radiación solar, con buen <i>mojamiento foliar</i> , la dosis dependerá del grado de ataque de la planta, en la primera etapa aplicar la dosis más baja	Cada 7 días
Repollo	Polilla de la Col (<i>Plutella xylostella</i>)	5-7 grs / lt	Aplicar en las horas con menor radiación solar, con buen <i>mojamiento foliar</i> , la dosis dependerá del grado de ataque de la planta, en la primera etapa aplicar la dosis más baja	Cada 7 días
Poroto	Gusano Cogollero (<i>Spodoptera sp.</i>)	10 grs/ lt	Puede ser aplicado como sebo o directamente a la planta	Aplicado como Cebo 1 vez cada 20 días

Compatibilidad con agroquímicos

Bacillus debe ser aplicado en forma separada de otros productos agroquímicos, a menos que se realice una prueba de compatibilidad. En el caso de aplicaciones con compuestos cúpricos y antibióticos, estos deben aplicarse antes del biocontrolado y espaciados a lo menos 5 días.



Almacenaje

La formulación de *Bf* es un polvo mojable, el que mantenido en un ambiente seco y fresco es capaz de mantener su población y actividad por 12 meses. Una vez abierto el envase de *Bf*, debe evitarse su contacto con la humedad, en caso contrario debe utilizar inmediatamente.

Toxicidad

Las especies de *Bf*, seleccionadas en el presente proyecto presentan baja toxicidad para mamíferos, pese a lo cual se deben tomar las medidas de seguridad, propias de toda aplicación fitosanitaria. Debe evitarse la ingestión y el contacto con mucosas y heridas en la piel, en caso de ocurrir realizar lavados con abundante agua y jabón y en caso de ingestión no inducir vomito. Este biocontrolador no posee carencias ni tolerancia y el período de reingreso es de 2 horas.

Forma de aplicación

El formulado en polvo desarrollado durante el proyecto, esta compuesto por esporas de la bacteria y los compuestos obtenidos durante la fermentación de esta, mas un acarreador en base a arcillas. Estas esporas son capaces de soportar temperaturas de 80° C y falta absoluta de humedad, pero la bacteria una vez germinada requiere de temperaturas de inferiores a 35° C y humedad para desarrollarse, por lo que las aplicaciones deben realizarse en las horas de menor temperatura durante el verano y las mas calidas durante el invierno en las horas de mayor temperatura. Debe realizarse un eficiente mojado del cultivo a tratar, dado que no se ha demostrado una actividad sistémica de *Bacillus*.

Costos El estudio de costos, se realizo en conjunto con Bio-Insumos Nativa Ltda. y se obtuvo un precio de equilibrio entre costos de producción, venta, administración, marketing y utilidades de \$30.000 el Kg. lo que lo hace competitivo con insecticidas de uso agrícola y lo mantiene a un precio menor que alternativas químicas .



Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio			
Producción (por producto)	3 cepa seleccionada para producción 400 ha	3 cepas seleccionadas	Se lograron seleccionar 3 cepas. Las cepas son menos exigentes en sus necesidades de producción que lo previsto.
Costos de producción	Precio de venta de \$20.000	Precio de venta de \$30.000	Aumento de precio de productos competidores.
Ventas y/o Ingresos	No aplica	No se han realizado ventas	
<i>Nacional</i>	No aplica		
<i>Internacional</i>	No aplica		
Convenios comerciales	No aplica		

Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual	1 técnico	1 agrónomo 2 técnicos 1 producto manager	Los equipos de producción requieren mayor preparación técnica y el sistema de secado requiere más mano de obra. La venta del producto requiere de alguien especializado para su comercialización.
Nuevos empleos generados	1	4	
Productores o unidades de negocio replicadas	1	1	



Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	1	1		Formulado de <i>Bacillus thuringiensis</i>
Proceso	Fermentación Formulado	Fermentación formulado		
Servicio	No aplica	No aplica		

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes		
<i>Solicitudes de patente</i>		
Intención de patentar	1	Formulado de 3 cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> . Para el control de lepidópteros
Secreto industrial	2	Sistema de producción y secado del formulado anterior
Resultado no patentable	3	3 cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> , para el control de lepidópteros.
Resultado interés público		

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica	1	Convenio con Universidad de Talca quien <i>Facilito las cepas estudiadas de Bacillus thuringiensis</i>
Generación nuevos proyectos		

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (Citas, título, descripción)
Publicaciones	2	En preparación
<i>(Por Ranking)</i>		
Eventos de divulgación científica	2	I Simposio de Control Biológico. Chillan 2005 Seminario "El Sector Agrícola y la Biotecnología: Situación Actual y Desafíos" Santiago 2005
Integración a redes de investigación		



Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (Título, grado, lugar, institución)
Tesis pregrado	1	
Tesis postgrado		
Pasantías		
Cursos de capacitación		