



Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides

Editores: Evelyn Silva-Moreno y Eduardo Tapia.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Boletín INIA / N° 419



ISSN 0717-4829





Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides

Editores:

Evelyn Silva-Moreno

Eduardo Tapia

INIA LA PLATINA

Santiago, Chile, 2020

BOLETÍN INIA N° 419

ISSN 0717 - 4829



Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides.

Editores:

Evelyn Silva–Moreno y Eduardo Tapia

Autores:

Fabiola Altimira, Bioquímica, Dra. INIA La Platina.

Nancy Vitta, Ing. Agrónomo, MSc. INIA La Platina.

Paulo Godoy, Ing. Agrónomo. INIA La Platina.

Eduardo Tapia, Ing. Biotecnología, Dr. INIA La Platina.

Director Responsable:

Emilio Ruz, Director Regional INIA La Platina

Cita Bibliográfica:

Altimira, F; Vitta, N; Godoy, P; Tapia, E. 2020. Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides. Boletín INIA N° 419. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación La Platina, La Pintana, Chile. 96 p.

© Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, 2020

Ministerio de Agricultura

Centro Regional de Investigación INIA La Platina

Av. Santa Rosa 11610

Fono: +56225779100

etapia@inia.cl

La Pintana, Santiago, Región Metropolitana

Chile

Todas las fotografías han sido realizadas por los autores del boletín excepto las adaptadas y citadas de la literatura consultada para este documento.

ISSN: 07174829

Permitida la reproducción parcial o total de esta obra sólo con permiso previo y por escrito del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA.

Diseño e Impresión:

Vladimir Bravo, Alameda Producciones SPA.

grafica.alamedaproducciones@gmail.com

Cantidad de ejemplares: 110

Impreso en Chile | Printed in Chile

Índice

Prólogo.....	6
--------------	---

Capítulo 1. Antecedentes biológicos de *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae)

1. Antecedentes generales	8
2. Descripción morfológica.....	9
3. Biología.....	15
4. Consideraciones finales.....	20
5. Bibliografía.....	21

Capítulo 2. Control biológico sobre *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermueler)

1. Antecedentes generales	22
2. Control biológico con enemigos naturales.....	22
3. Control etológico o semioquímico.....	26
4. Aplicación de sustancias de naturaleza mineral.....	30
5. Investigaciones INIA.....	30
6. Consideraciones finales.....	33
7. Bibliografía.....	34

Capítulo 3. Microorganismos con actividad entomopatógena

1. Antecedentes generales	35
2. Hongos entomopatógenos	35
3. <i>Bacillus thuringensis</i>	44
4. Referencias.....	48

Capítulo 4. Plaguicidas microbianos en base a hongos entomopatógenos: una alternativa para el manejo integrado de *Lobesia botrana*

1. Introducción.....	52
2. Metodología general.....	56
3. Resultados.....	57
4. Propuesta de manejo integrado de <i>Lobesia botrana</i>	71
5. Conclusiones.....	73
6. Bibliografía.....	75

Capítulo 5. Metodologías de Transferencia Tecnológica para el control invernadero de *Lobesia botrana* con hongos entomopatógenos

1. Antecedentes Generales.....	76
2. Transferencia y Extensión.....	78
3. Actividades de Capacitación.....	82
4. Metodología de enseñanza interactiva.....	84
5. Evaluación de conocimientos.....	84
6. Visitas Técnicas.....	88
7. Validación Tecnológica.....	89
8. Difusión del Proyecto.....	93
9. Conclusiones.....	95
10. Bibliografía.....	96

Prólogo

Una de las principales plagas que amenaza la oferta exportadora de uva de mesa en Chile es la polilla del racimo de la vid, *Lobesia botrana* (Denis & Shiffermüller) (Lepidóptera: Tortricidae). Esta plaga originaria de Europa fue detectada por primera vez en Chile, el 2008, en la zona de Linderos, Región Metropolitana. Debido al grave daño fitosanitario que genera en los cultivos de exportación, como uva, arándano y ciruela, el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) la declaró bajo control obligatorio mediante la Resolución N°5.916 de 2016 modificada por la Resolución N° 3.213 de 2017.

Bajo el marco de esta Resolución del SAG, el Programa Nacional de *Lobesia botrana* (PNLb) invitó al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) como entidad consultora y asesora en los planes de manejo integrado de esta plaga. Desde entonces, la alianza estratégica entre INIA-SAG, con el apoyo de la Fundación de la Innovación Agraria (FIA), han permitido el levantamiento información valiosa acerca de la fenología de este insecto, concibiendo un modelo de alerta para el control de *Lobesia botrana* en Chile que se transformó en un eje central la estrategia de mitigación.

En la actualidad se presentan 3 grandes desafíos en el control de *Lobesia botrana*: (1) reducir la intensidad del uso de agroquímicos, apuntando a la generación de una cadena de valor sustentable, además de fortalecer la inocuidad para la producción agrícola de alimentos seguros y saludables; (2) controlar *L. botrana* en las áreas urbanas en donde existe un acceso restringido a las plantas infestadas en las casas junto a su difícil control químico por la cercanía a las personas y (3) mitigar la contribución del cambio climático que promueve un mayor número de vuelos y ciclos reproductivos.

Con el objetivo de responder a estos desafíos INIA, con apoyo de SAG y FIA ejecutó el proyecto "Desarrollo de un biopesticida en base a hongos entomopatógenos para biocontrol y/o manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides como una alternativa sustentable en el cambio climático PYT-2017-0182".

La iniciativa estuvo orientada a disminuir las brechas tecnológicas, respecto al desconocimiento de controladores biológicos en base a microorganismo para la mitigación de poblaciones de *Lobesia botrana*. la falta de adopción de tecnologías de control sustentables con el medio ambiente y la falta de control invernal de la plaga. La respuesta a esto último fue el desarrollo de alternativas para con-

trol en esta época, donde *L. botrana* se encuentra en estado de pupa. Sumado a lo anterior, se realizaron ensayos en otras regiones (Libertador General Bernardo O´Higgins y Valparaíso), con el objetivo de validar y mejorar los resultados de eficacia del proyecto.

En forma paralela, el equipo de extensionistas de INIA formaron grupos de trabajo basados en la metodología de Grupos de Transferencia de Tecnología (GTT). Durante el transcurso del proyecto, los extensionistas realizaron capacitaciones sobre el uso y beneficios de los agentes microbianos empleados en este proyecto para el control de *Lobesia botrana* a los agricultores del Programa de Desarrollo Local (Prodesal), correspondiente Isla de Maipo y Lampa, ambas comunas en la Región Metropolitana.

A continuación, se entrega, de forma sistematizada, los principales resultados de este trabajo desarrollado por tres años. Asimismo, se describe la biología y comportamiento de la plaga y su control en el territorio nacional gracias al conocimiento generado en los estudios de INIA.

Capítulo 1

Antecedentes biológicos de *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae)

Nancy Vitta P.

Ing. Agrónomo, MSc.

nvitta@inia.cl

1. Antecedentes generales

Esta plaga fue descrita por primera vez por Denis y Schiffermüller en Austria, como *Phalaena Tortrix botrana* (Denis & Schiffermüller), en NTTR. Su nombre actual es *Lobesia botrana* Den et Schiff. La polilla europea de la vid *L. botrana* (Denis y Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae) es una polilla polífaga que se desarrolla en plantas de varias familias. Este tortricido presenta de dos a cuatro generaciones en Europa y, generalmente, tres en el área de Burdeos. Mientras que en el sur de Europa *L. botrana*, completa entre 2 y 3 generaciones anualmente, aunque el número de generaciones varía de una en el norte de Europa, a cinco en Asia Central. En el caso de Chile, hay al menos tres y posiblemente cuatro generaciones.

Hasta la fecha es una de las plagas de viñedos más nocivas en los países productores de vid europeos y mediterráneos. Los daños se centran en los racimos, permitiendo el inicio de varias infecciones por hongos como *Botrytis cinerea* (Persoon: Fries) (*Sclerotiniaceae*). Lo anterior, conlleva que se pudran las uvas a mediados de temporada y aumente la severidad del moho gris en la cosecha o pudrición de *Aspergillus negro* (*Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius*) que son productores de ocratoxina A. Estas infecciones a menudo están relacionadas con la actividad de alimentación larval de *L. botrana*. Sus larvas se alimentan de flores de vid y bayas, con una diapausa facultativa y un número variable de generaciones por año, dependiendo de la temperatura y el fotoperíodo. Por lo general, se informa como trivoltina en áreas mediterráneas, aunque, en los años más cálidos, una cuarta generación parcial ha sido reportada. Los primeros adultos de *L. botrana* aparecen en la primavera y luego, son seguidos por la primera generación de larvas que se alimentan de inflorescencias y brotes; en el norte de Italia, esto ocurre entre mayo y junio.



En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) la detectó, oficialmente, a comienzos de abril del 2008, cuando el insecto se encontraba en su tercera fase generacional. La mayor información sobre la fenología del daño causado por esta especie se ha reunido mediante observaciones y evaluaciones de los programas de monitoreo sobre la vid vinífera y uva de mesa conducidos, principalmente, por autoridades fitosanitarias y otros centros de vigilancia.

De acuerdo a Hahneemann (1961), Balachowsky (1966) y Gómez Bustillo (1979), podemos situar sistemáticamente a *Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller (1776), como sigue:

2. Descripción morfológica

2.1. Huevo

Reino.....	Animal (Sensu Linnaeus. 1758)
Filo.....	Artropoda (Siebol, 1946)
Clase.....	Insecta (Linnaeus, 1735)
Subclase.....	Pterigogenea (Brauer, 1885)
Superorden.....	Mecopteroidea (Tillyard, 1926)
Orden.....	Lepidoptera (Linnaeus. 1746)
División.....	Heteroneura (Tillyard, 1918)
Suborden.....	Ditrysa (Borner, 1939)
Superfamilia.....	Tortricioidea (Comstock, 1924)
Familia.....	Tortricidae (Stephns, 1829)
Subfamilia.....	Olethreutinae (Washington, 1897)
Tribu.....	Olethreutini (Obrastosov, 1946)
Genero.....	<i>Lobesia</i> (Guenee, 1845)
Especie.....	<i>botrana</i> (Denis & Schiffermüller, 1776)

Los huevos son depositados individualmente sobre superficies lisas de ramilletes florales y en las siguientes dos generaciones son puestos aisladamente sobre las bayas. En ningún caso, en placas ovígeras que contengan varias de estas unidades.

El huevo de *L. botrana* es elíptico, aplanado y ligeramente convexo. Cada huevo mide aproximadamente 0,65–0,90 mm de largo por 0,45–0,75 mm de ancho. Cuando recién son puestos, los huevos son translúcidos, de color blanco cremoso (Figura 1A), tornándose amarillo pálido, a medida que envejece. El color blanco cremoso iridiscente del huevo se vuelve amarillo (Figura 1B) y luego se ennegrece observándose la cabeza de la larva en desarrollo, aunque la incubación dura, normalmente, sólo unos pocos días (Figura 1C). El paso siguiente es la eclosión o salida de la larva (Figura 1D). Tras haber emergido la larva y abandonado el huevo, de este queda sólo el caparazón o huella redondeada y nacarada, produciéndose la eclosión entre los 7 y 9 días desde la ovipostura (Figura 1E).

El umbral de temperatura más bajo para el huevo, el desarrollo larval y pupal es, aproximadamente, de 8°C. Las hembras depositan los huevos de primera generación por separado o en grupos de dos o tres en yemas, pedicelos y flores; mientras que las hembras de la segunda y tercera generación depositan huevo en bayas de uva.

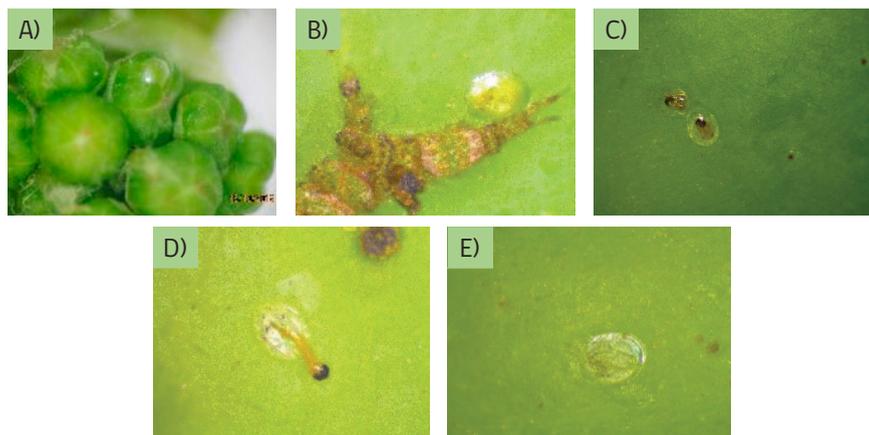


Figura 1. A) Huevo blanco cremoso. B) Huevos amarillos. C) Huevo cabeza negra. D) Eclosión larva. E) Huella redondeada y nacarada (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

2.2. Larva

La larva pasa por cinco estados larvarios: estado I (L1: 0,9–1,0 mm), estado II (L2: 1,9–3,0 mm), estado III (L3: 4,5–5,0 mm), estado IV (L4: 6,0–7,0 mm) y estado V (L5: 10,0–11,0 mm). La larva neonata que sale del huevo tras la eclosión mide

0,9–1,0 mm de longitud, siendo su cápsula cefálica de color negro y el cuerpo blanquecino y delgado, provisto de pelos proporcionalmente muy largos (**Figura 2A**) y el escudo protorácico más pálido que el resto del cuerpo. Las larvas más viejas tienen cabeza más clara, de color marrón amarillento, con un borde oscuro en el borde posterior (más cercano a el cuerpo) del escudo protorácico (segmento detrás de la cabeza) (**Figura 2B**). Mientras que las larvas jóvenes tienen cuerpos bronceados (**Figura 2C**).

A medida que va pasando de L1 a L5 aumenta notablemente de tamaño, llegando a medir de 10,0 a 15,0 mm. La larva madura varía de color amarillo claro a marrón pálido, dejando ver, en ocasiones (transparencia) el contenido intestinal. Cabeza de color marrón, escudete torácico, color marrón más oscuro que la cabeza (**Figura 2D**). Las larvas de quinto estadio hacen girar un capullo de seda blanco grisáceo en el que pupan (**Figura 2E**). El color de la larva varía de acuerdo a la alimentación. La larva en su estado completo de desarrollo es de color verdoso amarillento, a veces algo marrón o grisáceo.

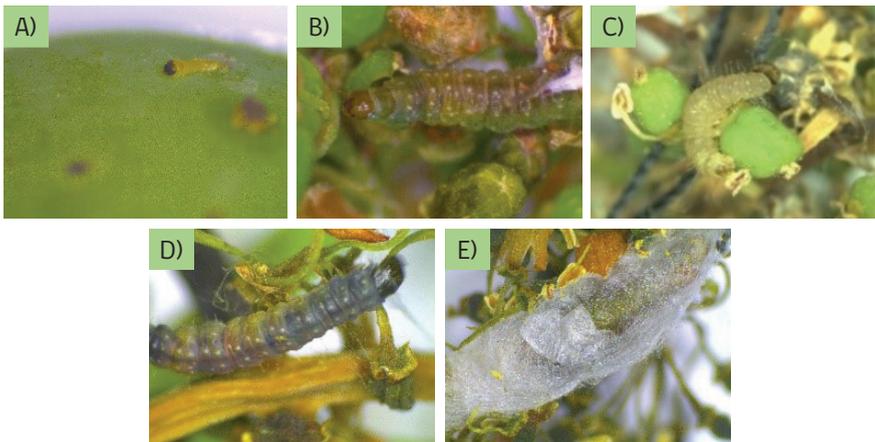


Figura 2. A) Larva neonata. B) Larva más vieja cabeza más clara de color marrón amarillento. C) Larva joven. D) Larva madura. E) Larva de quinto estadio hacen girar un capullo de seda blanco grisáceo para el proceso de pupación (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina).

La larva de *L. botrana* se diferencia de otras polillas de tortricidos (ejemplo de *Proeulia auraria*), porque en la cabeza presenta una mancha genal corta, una mancha oscura en la zona ocelar y pinaculas más claras que en el resto del cuerpo (**Figura 3**).



Figura 3. Caracterización larva *L. botrana* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina).

El desarrollo larval completo ocurre entre los 20 y 28 días aproximadamente o 170 grados-días para larvas alimentándose de flores y 225 grados-días para la alimentación de larvas en bayas. Individuos sin diapausa de la primera y segunda generación pupan en hojas enrolladas o inflorescencias atadas con seda. La generación de primavera de *L. botrana* generalmente no tiene importancia económica directa, excepto en fructificación sobre cultivares de vino. Larvas de generaciones carpófagas reducen la producción de bayas, pero el daño es causado principalmente por las consiguientes infecciones fúngicas y bacterianas. Sin embargo, la segunda generación es más dañina para variedades de maduración temprana, mientras que la tercera generación es más perjudicial para variedades de maduración tardía.

2.3. Pupa

Las pupas se esconden en las cortezas de las plantas de vid, en los pliegues de las hojas, en los racimos o en el suelo. Están siempre envueltas por un capullo sedoso, blanco, fusiforme y continuo de forma que constituye una envoltura completa que no deja ver la crisálida; únicamente tiene una imperceptible discontinuidad por donde debe salir el adulto y que está formada por dos labios, aplicándose exactamente uno sobre otro.

La pupa es alargada y de color marrón oscuro, midiendo 5,0-6,0 mm de longitud por 1,6-1,7 mm de ancho (**Figura 4**). Como muchos tortricidos, la pupa es inicialmente marrón verdoso y luego marrón oscuro. La longitud promedio de las pupas machos y hembras de 5,5 mm y 7,0 mm, respectivamente.



Figura 4. Diferencia de colores de pupas de *L. botrana* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina).

Las pupas pueden diferenciarse (**Figura 5**) en macho y hembra. El macho presenta 4 segmentos abdominales y la hembra 3 segmentos. Se pueden observar claramente los ojos, antenas, alas y segmentos abdominales. Generalmente, la pupa hembra es de mayor tamaño que el macho.



Figura 5. Pupas *L. botrana*. Izq. Hembra. Der. Macho.

L. botrana pasa el invierno en estado de pupa bajo la corteza o el ritidomo de la vid (**Figura 6**), encerrada dentro de un capullo de color blanco. En primavera, en coincidencia con la brotación y floración de la vid, comienzan a emerger los adultos provenientes del estado de pasaje invernal.



Figura 6. Pupa *L. botrana* en ritidomo de vid (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

Aunque las pupas estén en diapausa (estado fisiológico de inactividad) todo el invierno, su intensidad respiratoria va variando a lo largo del periodo invernal, aumentando al transcurrir el tiempo. Sin embargo, el hecho más notable durante la fase de hibernación, es la elevada mortalidad natural que sufre el insecto por predación, parasitismo y patógenos fúngicos. El desarrollo completo de pupas pasa en aproximadamente 12-14 días, o 130 días de grado, para ciclo sin diapausa. La diapausa de individuos del tercero o posteriores generaciones pupan debajo de la corteza, en el suelo o debajo de la hojarasca; los adultos emergen la siguiente primavera.

2.4. Adulto

El estado adulto presenta un largo de 6,0-8,0 mm y una envergadura alar de 11,0 -13,0 mm (**Figura 7**), puede presentar ambos sexos, un diseño dorsal provisto de una banda transversal en el par de alas anteriores, que se visualiza al encontrarse las alas en reposo plegadas sobre el cuerpo. Los machos carecen de un pliegue costal del ala anterior; el ala posterior es blanquecina con una periferia marrón, mientras que, el ala trasera femenina es completamente marrón. Este primer par de alas termina con un fleco color marrón que otorga un aspecto jaspeado característico que hace inconfundibles a los adultos.



Figura 7. Adultos *L. botrana* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

3. Biología

La emergencia de los imagos y/o adultos de las pupas invernantes tiene lugar en primavera, en función de las condiciones climáticas, las que varían según zona y año. Esta salida primaveral de adultos es muy escalonada, ya que según la fecha de pupación y el lugar de invernación la influencia climática, será diferente.

Los vuelos de primera generación pueden comenzar cerca del brote y continuar por cuatro a cinco semanas; los machos comienzan a emerger cerca de una semana antes que las hembras. Los adultos viven de una a tres semanas, vuelan al anochecer (por encima de 12,2°C), y se aparean en vuelo (1 a 6 días después de la emergencia). Las hembras generalmente se aparean una vez en su vida. La postura de huevos comienza de uno a dos días después del apareamiento, cada hembra puede llegar a poner entre 80 a 160 huevos. Los huevos de primera generación son colocados individualmente en superficies planas cerca o dentro de flores en el racimo, la eclosión se produce de 7 a 11 días.

La duración del periodo de incubación, es decir, la evolución del proceso de embriogénesis, está fuertemente influida por la temperatura; la supervivencia de los huevos está influida por acción combinada de la humedad y la temperatura. En esta primera generación, teniendo en cuenta que las irregulares condiciones climáticas primaverales no son la óptimas para el huevo, el periodo de incubación suele durar una semana o algo más. La larva neonata de 1,0 mm de longitud aproximadamente, es muy ágil. Larvas juntas o individuales en las flores forman "nidos" antes y durante la floración. Estos glomérulos están formados por la agrupación de varias flores o botones florales desecados (**Figura 8**), incluso,

aunque es más raro, pequeñas bayas recién formadas y atacadas, junto con los excrementos del insecto y pequeños detritus vegetales unidos por la malla de hilos sedosos segregados por la larva.



Figura 8. Glomérulos *L. botrana* en racimos de vid (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

En condiciones óptimas de 26, 7° C a 29,4 ° C y 40% a 70% de humedad relativa, el desarrollo larvario se completa entre 20 a 30 días. Las pupas se forman dentro de los capullos en el racimo de flores, en un lóbulo doblado de una lámina de la hoja, debajo de la corteza o en grietas del suelo. Los adultos emergen 6 a 14 días después de la pupación. Por lo tanto, las generaciones posteriores de la temporada, tienen el potencial de causar mayor daño a los cultivos que las primeras generaciones de la temporada. En otoño, con noches más largas de 11 horas aproximadamente, las larvas inician su diapausa. Además, una pupa en diapausa resiste temperaturas más bajas que una pupa sin diapausa y puede tolerar incluso los inviernos más fríos del norte de Europa. A comienzos de febrero, durante el desarrollo posterior a la diapausa, antes de la emergencia del adulto, las pupas pueden morir a temperaturas inferiores 7,8°C.

Bajo condiciones locales *Lobesia* presenta un ciclo de tres generaciones anuales, la última con densidad poblacional muy variable y con periodos de vuelo incluso prolongados hasta el inicio de otoño. El número de generaciones está determinado por una combinación de varios factores incluyendo fotoperiodo, temperatura en relación al umbral de desarrollo y microclima junto con la baja humedad, latitud y tipo de alimentación.

3.1. Daños

El racimo generalmente está infestado con múltiples larvas que se alimentan individualmente de las bayas de mejor calidad. Las perforaciones o daños pro-



vocadas por su ingreso a la baya, propician la infección por hongos causantes de la podredumbre del racimo, originadas principalmente por *Botrytis cinerea* (Figura 9).

Figura 9. Fruta infestada por *Botrytis cinerea* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

Los daños ocasionados por este insecto son producidos por las larvas al alimentarse de flores y frutos desde cuaje hasta maduración, con la consecuente disminución de rendimientos y pérdida de calidad en uvas, sobre todo cuando la misma es destinada a consumo en fresco. En vid no se alimenta de hojas ni de otras partes de la planta.

Las larvas de *L. botrana* dañan la vid alimentándose de flores, brotes y frutas. Las larvas de primera generación se alimentan de los botones florales, lo que resulta en rendimientos reducidos, mientras que las larvas de segunda y tercera generación se alimentan de uvas maduras. Los umbrales económicos para *L. botrana* en uva varían con las condiciones climáticas, tipo de uva (vino o mesa) y cultivar (Figura 10). La primera generación se desarrolla en inflorescencias (antófago); donde las larvas forman el llamado glomerulo o nido. Las siguientes generaciones se desarrollan en bayas (carpófago). En viñedos, *L. botrana* hiberna en la etapa pupal debajo de la corteza exfoliante y en grietas del tronco y cordones.

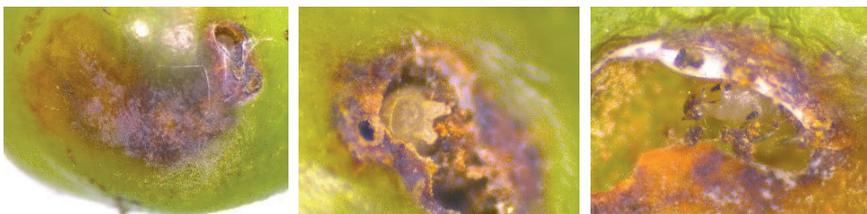


Figura 10. Daño en bayas de vid por larvas de *L. botrana* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

3.2. Mecanismos de dispersión

Las principales formas de dispersión de la plaga hacia nuevas regiones son mediante el transporte de productos con el organismo vivo o bien por la propia capacidad de volar de los adultos, sumando a esto la incidencia de los vientos. En el caso del comercio internacional, la polilla puede diseminarse en forma de pupas que pueden encontrarse en el material vegetal propagativo. La forma más común de este material son estacas y sarmientos de vid.

La dispersión, a través de los adultos, no es tan importante ya que en general no vuelan distancias mayores a 80 metros. Las plantas aisladas de vid que existan fuera de las unidades productivas (en casas particulares, por ejemplo) representan un foco muy importante de infestación y posterior dispersión de la plaga.

En resumen, una vez fecundadas las hembras de la primera generación, depositan los huevos aisladamente sobre la corola de los botones florales y las siguientes generaciones sobre los racimos.

El incremento de los huevos tiene lugar al cabo de pocos días. La larva ataca los botones florales, uniéndolos con unos hilos sedosos, formando un “glomérulo” fácilmente reconocible. Al final del periodo larvario, la larva teje un capullo, en cuyo interior se forma la pupa o crisálida; casi la mitad lo hacen en repliegues de las hojas y el resto en la corteza de las cepas, racimos, suelo y otros. Al cabo de 5-10 días salen los nuevos adultos que repiten el ciclo, teniendo normalmente 2 ó 3 generaciones al año, aunque pueden tener más, dependiendo de las condiciones climáticas y hospederas. En la 2ª y 3ª generación, la puesta tiene lugar sobre bayas, verdes o en fase de maduración (**Figura 11**).

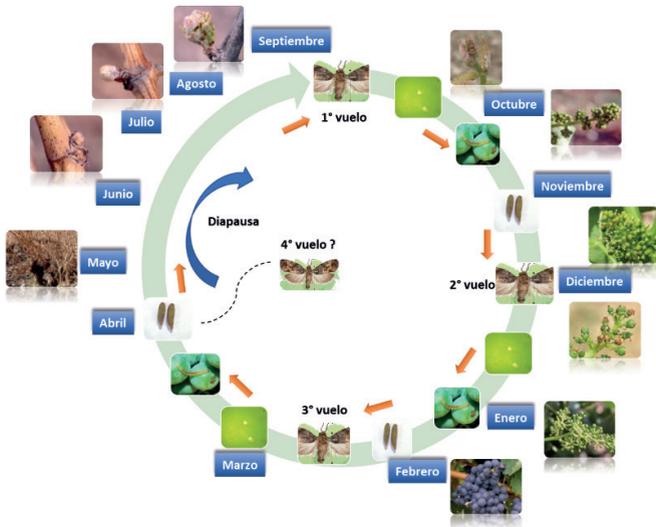


Figura 11. Ciclo biológico *L. botrana*

4. Consideraciones finales

La polilla del racimo de la vid es una plaga que se conoce por ocasionar daños directos como indirectos, éstos últimos a consecuencia de la acción de microorganismos que ocasionan podredumbres. Los daños que esta plaga produce al viñedo y otros frutales son debidos a las larvas que afectan al racimo y otros frutos. Las larvas pertenecientes a la primera generación se denominan generación antófaga, debido a que atacan al racimo en periodo de floración o próximo a este, alimentándose de botones florales, flores o, en algunas ocasiones, de pequeños frutos recién cuajados. Según se va desarrollando la larva, une varios botones florales mediante hilos de seda formando los denominados glómérulos, en los cuales vive la larva. A pesar de ello, los daños que ocasionan las larvas de la primera generación en relación con la cantidad y la calidad de la cosecha tienen una mínima repercusión. Al contrario, las larvas procedentes de la segunda generación que atacan las bayas que están en fase de desarrollo, perforando el hollejo y alimentándose de su pulpa. Además, estas bayas terminan por secarse, caerse o pudrirse, dependiendo de su tamaño y de la humedad ambiental, aunque algunas llegan a cicatrizar y terminan su desarrollo. Adicionalmente, el daño que producen las larvas de la tercera generación tiene un efecto similar al de la segunda generación (ambas denominadas generaciones carpófagas). La diferencia reside en que, cuando las larvas de la tercera generación atacan las bayas, éstas se encuentran maduras o en fase de maduración. Por ello, cuando atacan las bayas haciendo orificios, salen los jugos azucarados de su interior que favorecen la proliferación de los microorganismos responsables de las podredumbres, repercutiendo en el agravamiento de los daños.

Finalmente, *L.bostrana* inverna en forma de crisálida en diapausa, escondida en diversos lugares: bajo la corteza de las parras, suelo, hojas caídas, márgenes de tutores, etc. En primavera, al aumentar la temperatura, emergen los adultos, siendo su salida muy escalonada, iniciándose antes de la brotación de la viña u prologándose durante varias semanas. Según el lugar de hibernación, la influencia climática será diferente. Los primeros adultos son, en general, machos (protandria), pero al final del periodo de vuelo predominan las hembras. Su vuelo es crepuscular; permaneciendo inactivos durante el día, escondidos en hojas y racimos.

5. Bibliografía

Balachowsky, A. 1966: Entomologie appliquée a l'Agriculture. Tome II. Lepidopteres, primer volumen, pp. 859-887. Ed. Masson et Cie. Paris

Coscollá, R. 1997. La polilla del racimo (*Lobesia botrana* Den y Schiff). Editorial Generalitat Valenciana. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación, España.

Gómez-Bustillo, M. Arroyo-Varela, M. y J. Yela-García. 1979: Mariposas de la Península Ibérica. Heteróceros III. Superfamilias: Cossoidea, Zygenoidea, Bombycoidea & Sphingoidea. MAPA. ICONA. Madrid. 300 pp.

Capítulo 2

Control biológico sobre *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermueler)

Nancy Vitta P.

Ing. Agrónomo, MSc.

nvitta@inia.cl

1. Antecedentes generales

Las larvas de *Lobesia botrana*, de primera generación, dañan las inflorescencias mientras que, la segunda y tercera generación, dañan las bayas verdes y maduras. Los daños causados por la tercera generación son de gran importancia económica. Además, el daño directo suele ir acompañado del daño indirecto por la infección de la uva por el hongo *Botrytis cinerea* Persoon. Las larvas transmiten el hongo a las bayas de los racimos y la presencia de este hongo mejora el desarrollo larvario.

Dentro de las alternativas de control, para los daños que provoca esta plaga, se encuentra el *Control Biológico*. Su estrategia consiste en favorecer el uso y la conservación de enemigos naturales nativos, ya presentes en el ecosistema, en lugar de introducir especies exóticas. Para tener éxito en este tipo de programa de control, es esencial tener un buen conocimiento de la identidad de los enemigos naturales presentes y ambiente de la plaga, así como la influencia de este, variación en la estructura y diversidad de la comunidad parasitoide. En paralelo, también es crucial entender la naturaleza e interacciones entre la plaga, sus plantas hospederas y sus parasitoides. Además, se debe considerar las especies y variedades de plantas que difieren en su aleloquímica y puede afectar el rendimiento de herbívoros y parasitoides

2. Control biológico con enemigos naturales

2.1. Depredadores

Se tiene referencia de numerosas especies depredadoras de *L. botrana*. Así, el "Predator Host Catalogue" de Thompson y Simmonds (1960), incluye 21 especies de insectos depredadores de la polilla del racimo, destacando algunos neu-



rópteros, sobre todo crisópidos (*Chrysoperla carnea*) (**Figura 1**), y coleópteros (coccinélidos, carábidos, cléridos, malaquíidos), citándose también algunos dermápteros e himenópteros, incluso algún hemíptero.



Figura 1. *Chrysoperla sp.* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

2.2. Parasitoides

Existe una extensa fauna capaz de parasitar a *L. botrana*. Ruiz Castro (1943), elaboró una lista de diversas especies, entre las cuales se incluían: himenópteros (icneumónidos, calcídidos y braconídeos) y dípteros taquínidos (**Figura 2**). En otra lista redactada por Thompson (1964) se citan 97 especies que pueden parasitar a la polilla del racimo, entre las cuales figuran: dípteros taquínidos (ejemplo *Phytomyza nigrina* (Meigen, 1824)) e himenópteros, figurando por orden de importancia icneumónidos (*Campoplex capitator*), pteromálidos y calcídidos, entre otros.



Figura 2. Adulto de taquínido emergiendo de pupa de *L. botrana* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

Se destaca *C. capitator* (**Figura 3**), debido a que este endoparasitoide larval solitario tiene una amplia distribución geográfica y ha sido regularmente observado en la mayoría de los viñedos europeos (Italia, España, Suiza, Francia). La capacidad de *C. capitator* para parasitar las pupas en diapausa de *L. botrana* indican que pueden parasitar la tercera generación de larvas de *Lobesia* a finales de otoño. Debido a su eficiencia natural, densidad y amplia distribución geográfica, puede proporcionar un importante control natural de la población de *L. botrana*. Un lanzamiento de esta especie parasitoide, a principios de la temporada, podría reducir la reproducción de generaciones posteriores de la polilla.

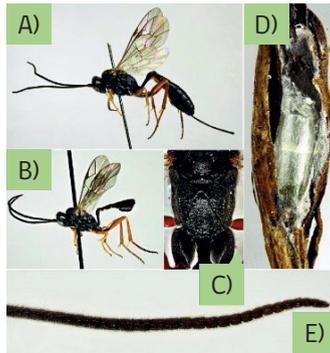


Figura 3. *Campoplex capitator* Aubert, 1960 (hembra y macho: IT, San Rossore Pisa ex *Lobesia botrana*). A) Hembra, vista lateral. B) Macho, vista lateral. C) Propodeo hembra, vista dorsal. D) Capullo abierto, nido seco sobre *Daphne gnidium*. E) Antena distal hembra (24 artejos) (Fuente: Scaramozzino et al, 2018).

La mayoría del parasitismo tiene efecto sobre las crisálidas invernantes, aunque existen especies que afectan a huevos, larvas o crisálidas no invernantes, pero con tasas de parasitismo bastante inferiores.

Para el caso de *L. botrana* se efectuaron muchos ensayos con diferentes insectos entomófagos, pero la mayoría de los trabajos se centró en el estudio de la utilización de himenópteros, más específicamente, los del género *Trichogramma* (**Figura 4A, 4B**), los cuales actúan como parasitoides oófagos (de huevos).

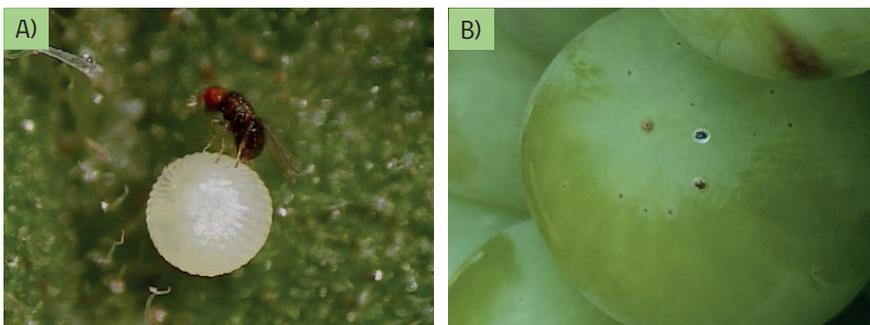


Figura 4. *Trichogramma* sp. A) Adulto. B) Huevos de *L. botrana* parasitados por *Trichogramma* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

Asimismo, los Icneumónidos (**Figura 5**) han sido muy estudiados debido a su posible utilización en el control biológico de plagas, ya que son parasitoides de larvas y crisálidas de una gran variedad de insectos. Entre los parasitoides estudiados, que ha cobrado gran importancia, encontramos el pteromáldido de la especie *Dibrachys affinis* Masi. En los diferentes ensayos realizados sobre parasitismo se ha podido constatar que el efecto que ejerce *D. affinis* sobre las crisálidas es bastante significativo, llegando a alcanzar tasas de parasitismo muy elevadas, del orden incluso del 88%.



Figura 5. Adultos de Ichneumonidae (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

Otro grupo de parasitoides con los que se han realizado algunos ensayos, es un miembro perteneciente a la familia de los braconidos (*Apanteles* sp) (**Figura 6**). Este grupo de parasitoides tiene una distribución mundial, gran parte de ellos, son ectoparásitos que se desarrollan sobre larvas de coleópteros y lepidópteros.



Figura 6. Adulto *Apanteles* sp. (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

La presencia de un entorno natural, circundante al viñedo, puede desempeñar un papel crucial como reservorio de biodiversidad, cuyos beneficios pueden extenderse al propio viñedo, por la colonización de otros parasitoides a las zonas afectadas por esta plaga. También se ha demostrado, en otros ensayos realizados recientemente, que las larvas de *L. botrana* se desarrollan más rápidamente en respuesta de señales percibidas de la presencia de parasitoides. Esto puede ser debido a una adaptación defensiva con el fin de evitar los ataques del parasitoide, fenómeno que cobra gran importancia en la lucha biológica.

3. Control etológico o semioquímico

En el caso de *L. botrana*, el mensaje de comunicación sexual para llamar al apareamiento por parte de la hembra no está formado por una sola sustancia. Se han hallado, al menos, 15 cadenas rectas, compuestos de alcohol y acetato, tres de los cuales son conductualmente activos. Estas sustancias se presentan, comercialmente, de dos maneras: *para el monitoreo y para el control de las poblaciones*. En el primer caso, se trata de trampas de feromonas que consisten en tres tapas de plástico (tipo triángulo), la de abajo con una cartulina engomada y en la parte superior se coloca una cápsula con feromona femenina para atrapar machos de la especie (**Figura 9**). El segundo caso de control de poblaciones es a través de confusión sexual que se explica a continuación.



Figura 9. Trampa feromona para el monitoreo y para el control de las poblaciones de *L. botrana* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

3.1. Confusión sexual

Las feromonas son mensajeros químicos, volátiles, liberados al ambiente y que influyen a distancia en el comportamiento de individuos de la misma especie. A diferencia de las hormonas, que son segregadas por glándulas endocrinas, las feromonas son segregadas por glándulas exocrinas, actuando como agente comunicador entre individuos de la misma especie. Aunque son segregadas en cantidades muy pequeñas, la capacidad de detección es enorme debido a su alta especificidad dentro de la misma especie, afectando el comportamiento de los insectos en su agregación, dispersión, alarma y comportamiento sexual. El fundamento de este método es sencillo. Consiste en impedir que el macho localice a la hembra por la nube de confusión generada por la feromona y, de este modo, se impida el apareamiento, descendiendo la población de la plaga y la aparición de larvas que provoquen daños en el racimo.

Por otro lado, para reducir los apareamientos y la reproducción, se utilizan los dispensadores, emisores o difusores (**Figura 10**). Estos son diseñados de manera diferente según la marca comercial, pero básicamente son dispositivos que llevan en su interior la feromona en forma líquida, para ser emitida y volatilizada al medio ambiente del cultivo en forma progresiva. La duración de esta emisión puede ser de hasta 6 meses.



Figura 10. Emisor de confusión sexual para control de *L. botrana* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

La técnica de confusión sexual funciona provocando una interferencia en la comunicación química olfativa de los insectos, mediante la distribución masiva de feromonas sintéticas en el campo por medio de difusores. Esto provoca una nube de feromonas que desorienta y confunde a los machos, impidiéndoles localizar a la hembra. Este método está basado en dos mecanismos distintos: uno es la competencia entre las hembras y los difusores en la atracción a los machos; y el otro se basa en el camuflaje de la pista olfativa ejercido por los difusores sobre las hembras, lo que las hace menos atractivas, este efecto varía en función la dosis de feromona y la distancia.

En el caso de *L. botrana*, los efectos ejercidos por los mecanismos de camuflaje y competencia juegan un papel importante sobre la confusión sexual según la situación de estos insectos. En la aplicación de este método, hay que tener en cuenta algunas consideraciones: la densidad de población de la plaga, ya que la eficacia del método va ligada a esta, siendo más eficaz cuanto menor sea la densidad poblacional de adultos. En este caso es más sencillo perturbar la comunicación sexual y menos probable que se produzcan encuentros fortuitos entre macho y hembra. Por otra parte, en el caso de los atrayentes, hay distintos aspectos a tener en cuenta como: la naturaleza de los difusores para asegurar su emisión durante todos los periodos de vuelo; la masa de follaje del viñedo, la cual influye en la conformación y mantenimiento de la nube de feromonas; y, finalmente, su correcta distribución, manteniendo su equidistancia y reforzar los bordes de la parcela, duplicando el número de difusores alrededor del perímetro.

La utilización de este método tiene una serie de ventajas, tales como: ser un

método ecológicamente limpio, que no deja residuo, es específico y respetuoso con la fauna, evitando así la alteración del equilibrio biológico. Por último, presenta un efecto acumulativo a lo largo de los años junto con ser cómodo de aplicar.

El método de control se basa en la colocación de emisores en el cultivo en número variable, según marcas comerciales (**Figura 11**). Por lo general, se colocan en los alambres del sistema de conducción de la vid o, según el modelo, en el pitón o cargador. Estos difunden la feromona volátil al medio ambiente, saturando el mismo y formando una especie de nube aromática. Los machos, debido a este exceso de estímulos, no pueden detectar la presencia real de las hembras produciéndose una disminución drástica del acoplamiento y consecuentemente de las oviposiciones. De esta manera, se produce una disminución de la densidad poblacional de la plaga y de los daños en el cultivo.



Figura 11. Emisor de confusión sexual para control de *L. botrana* instalados en el cargador (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

En general, es de fundamental importancia determinar el momento de colocación de los emisores en el campo. Se considera que el mismo debe efectuarse de manera temprana, inclusive antes de brotación. No hay inconvenientes por la duración de la emisión, ya que, al colocarlos temprano, debido a las temperaturas primaverales frescas, la emisión es menor. Es decir, la difusión de la feromona volátil es proporcional a las temperaturas, por lo cual la colocación temprana no afecta la duración total de la emisión, puesto que las temperaturas medias en ese momento son bajas. Se deben colocar trampas para el monitoreo de machos en los viñedos, en lugares donde no se hallen las feromonas, ya que la nube ge-

nerada por la colocación de los difusores en el campo impide también el normal funcionamiento de la trampa.

4. Aplicación de sustancias de naturaleza mineral

Se han realizado diferentes ensayos con productos de naturaleza mineral para potenciar el efecto de control de los pesticidas. Así, se ha utilizado una mezcla de cloruro de sodio y silicato de sodio como insecticidas, sobre todo con acción ovicida, donde presentan una mayor eficacia debido a su acción deshidratante que obstaculiza el desarrollo normal del proceso de incubación. Paralelamente, a estos ensayos se realizaron análisis en los mostos, para comprobar si el tratamiento con estos productos afectaba de alguna forma su composición, obteniéndose resultados similares a la de mostos procedentes de uvas no tratadas. A pesar de esto, todavía hay que seguir investigando sobre el tratamiento con productos a base de sales de sodio para encontrar la mejor concentración y aplicación.

También, se han realizado algunos estudios sobre la utilización del caolín, un material inerte, de naturaleza mineral, el cual no presenta toxicidad alguna. Se evaluó su eficacia, sobre huevos y larvas neonatas de *L. botrana*, también se estudió la influencia del caolín sobre algunos parasitoides de esta plaga, en concreto sobre *Trichogramma cacoeciae* (Marchal) (Pease *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos fueron muy prometedores, ya que la utilización del caolín, produjo una reducción en la oviposición y en la eclosión de los huevos de *L. botrana*, además de aumentar la mortalidad de sus larvas.

5. Investigaciones INIA

5.1. Desarrollo de modelos de alerta para el control de *Lobesia botrana* en Chile" Código PYT -2015-0097

En los últimos años, INIA desarrolló en conjunto con el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) el proyecto PYT-2015-0097 financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA). El objetivo del proyecto fue desarrollar modelos de alerta temprana basados en la interacción de grados días, humedad y distribución geográfica, para el control oficial de *Lobesia botrana* en Chile, que permitan determinar los momentos óptimos de aplicación de plaguicidas. Como resultado

adicional, se determinó parasitismo natural, en pupas de *L. botrana*, colectadas en Estaciones de Monitoreo de INIA.

Pupas de *L. botrana* de tercera generación durante la temporada 2015–2016 fueron colectadas de los cuarteles de cinco de las seis Estaciones de Monitoreo que mantuvo INIA, mediante el proyecto FIA –SAG “Desarrollo de modelos de alerta para el control de *L. botrana* en Chile”. Grupos de 50 o más pupas fueron instaladas en cámaras bioclimáticas a 7°C, 10°C y 14°C, con un 40 % HR y 10 horas de luz y 14 de oscuridad. Las pupas fueron instaladas a partir del 28 de abril del 2016 y el 14 de junio del 2016, determinando la presencia de parasitismo en dos de las Estaciones de Monitoreo (EM); Chépica, región de O’Higgins, Fundo Las Casas, predio que mantiene desde la temporada 2015–2016 confusión sexual y en la EM de Paine, región Metropolitana, sector de Champa, que no presentaba confusión sexual.

El parásito encontrado, como se presenta en la **Figura 12 y 13**, sería un parasitoide de pupas del Orden *Hymenoptera* Familia *Ichneumonidae*, de acuerdo a la identificación que se hizo en el Laboratorio de Entomología, se trataría del parasitoide nativo de pupas *Coccygomimus fuscipes*, el que de acuerdo con Lanfranco (1986), Neira (1983), y Prado (1991) tendría como hospederos a *Rhyacionia buoliana*, *Cydia molesta*, *Orgyia antiqua*, *Pieris brassicae* y *Rachiplusia nu*, de estos *R. buoliana* y *C. molesta* pertenecen a la misma familia de que *L. botrana* (Tortricidae).



Figura 12. Parasitoide de pupas de *L. botrana* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina) Figura 12. Parasitoide de pupas de *L. botrana* (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)



Figura 13. A). Parasitoide de pupas de *L. botrana* dentro de la pupa. B). Orificio en pupa de *Lobesia* donde emergió el parasitoide (Fuente: Laboratorio Entomología, INIA, La Platina)

Posterior a la identificación, los resultados del experimento se presenta en el **Cuadro 1** en donde el material que se mantuvo en crianza, en una EM con confusión sexual, a 10°C alcanzó un 40,7% de parasitismo. Su presencia en las cranzas podría estar indicando su importancia en la disminución de la plaga en tercera generación invernante en condiciones naturales, especialmente cuando se maneja bajo programas de Manejo Integrado de Plagas. De acuerdo con la literatura, es posible contar con este parasitoide de prepupas y pupas gran parte del año (aproximadamente 8 meses, desde septiembre hasta abril), lo que con liberaciones inundativas en los periodos de pupación de primera segunda y tercera generación, podría ser una alternativa más que se suma a parasitoides de huevos. Por otra parte, también se señala que su inespecificidad biológica la podría facultar para seleccionar sus hospederos dentro de una amplia variedad de especies de Lepidóptera. Las características de *Lobesia botrana* podría mostrar un buen recurso para su rol parasitoide, evaluación que debe ser realizada.

Cuadro 1. Porcentaje de parasitismo, por predio y por cámara bioclimática (INIA La Platina. Julio 2016).

Cámara (°C)	Predio	Total pupas <i>Lobesia</i>	Total adultos	Nº pupas parasitadas	% de parasitismo
14	Fundo Las Casas	54	4	20	37
10	Fundo Las Casas	54	9	22	40,7
14	Champa	50	1	0	2
10	Champa	50	0	2	4

6. Consideraciones finales

Algunas características del hospedero pueden afectar directamente a los enemigos naturales. Por ejemplo, mientras se alimentan, los parasitoides se encuentran con huéspedes de diferentes tamaños y calidad y puede seleccionar los hospederos más adecuados para el desarrollo de su descendencia. Muchos estudios han demostrado que las especies pueden desarrollarse con éxito en diferentes tamaños de huéspedes, pero a menudo prefieren un tamaño particular.

La eficiencia de los parasitoides en el control de la población de plagas depende de su capacidad de reducir significativamente su densidad. Si los parasitoides atacan sólo los hospederos juveniles sin afectar activamente el éxito reproductivo de estos, la elección de dicho parasitoide puede ser inadecuada para controlar la plaga. Además, el conocimiento del efecto de la planta huésped y la selección del huésped puede contribuir a una mejor comprensión de la dinámica de la población de plagas y parasitoides que se solicita para desarrollar con éxito programas biológicos.

En conclusión, los resultados de especies parasitoides y depredadores para *L. botrana* en viñedos de diferentes regiones indican que las especies que se utilizarán en un programa de control biológico variarán según la ubicación geográfica. Asimismo, su eficiencia puede verse afectada por los cultivares, de las cuales se alimentan las larvas de *L. botrana*. Consecuentemente, un éxito biológico en un programa de control contra *L. botrana*, no sólo debe considerar la plaga y el posible parasitoide, sino también las interacciones entre parasitoide, anfitriones y plantas hospederas en diferentes hábitats.

La continuidad en la aplicación de este método de control en el viñedo durante años consecutivos conlleva a la disminución progresiva de la densidad poblacional de la plaga, ofreciendo resultados de daños nulos o despreciables. La no aplicación del parasitoide y/o depredador en un año consecutivo da lugar a la recuperación de la plaga, aunque este método no necesita de un seguimiento estricto del ciclo biológico del insecto, por lo que es conveniente mantener cierta vigilancia, en los momentos de riesgo de daño, correspondiendo a la oviposición y momento de actividad larvaria de 2ª y 3ª generación.

7. Bibliografía

LanFranco, D. y L. Cerda. 1986. *Coccygomimus fuscipes* (HYM.: ICHNEUMONIDAE): Un Parasitoide Nativo de la Polilla del Brote, *Rhyacionia buoliana* (LEP.: TORTICIDAE). *Bosque* 7(1):36-37.

Meigen, J. 1824. Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. Hamm, 4: XII+1- 428.

Neira, M. y J. RUFF. 1983. *Coccygomimus fuscipes* (Brullé 1846) (Hymenoptera: Ichneumonidae) parasitoide de pupas de *Pieris brassicae* L. (Lep.: Pieridae) en Chile. *Agro Sur* 11 (1): 55-56.

Pease, C., López-Olguín J., Pérez-Moreno I. and V. Marco-Mancebón. 2016 Effects of Kaolin on *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) and Its Compatibility With the Natural Enemy, *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Economic Entomology* 109(2):740-5

Prado, E. 1991. Artropodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. INIA. Serie Boletín Técnico N° 169.

Scaramozzino, P., Di Giovanni, F., Loni, A., Ricciardi, R. and A. Lucchi. 2018. Updated list of the insect parasitoids (Insecta, Hymenoptera) associated with *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera, Tortricidae) in Italy. 2. Hymenoptera, Ichneumonidae, Anomaloniinae and Campopleginae. *ZooKeys* 772: 47-95.

Thompson W.R. and Simmonds F.J. 1960. Catalogue of the parasites and predators of insects pests, Sectio III. Predator Hos Catalogue. Commonwealth, Agricultural Bureaux, Central Sales, Bucks, England, 204 p.

Thompson, W.R. 1964. Section III. Predator Host Catalogue. pp. 168-169

Capítulo 3

Microorganismos con actividad entomopatógica

Fabiola Altimira P.

Bioquímica, Dra.

fabiola.altimira@inia.cl

1. Antecedentes generales

A pesar de que los microorganismos entomopatógenos, tales como hongos, bacterias y nematodos son prometedores pesticidas biológicos para el control de insectos, existen pocos productos registrados y adoptados en programas de manejo integrado de plagas. A continuación, se realizará una concisa revisión de la historia y mecanismo de acción insecticida de los hongos y bacterias con actividad entomopatógica.

2. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HEP) son microorganismos que poseen la capacidad de infectar y matar artrópodos. Esta capacidad ha permitido que se utilicen como una alternativa segura a los insecticidas químicos tóxicos para el control de plagas. Las especies pertenecientes al orden Hypocreales, conformado por más de 750 especies de HEP, han sido ampliamente estudiados y utilizados en biocontrol debido a que tienen un rango de huéspedes relativamente amplio y son fáciles de producir a gran escala (But et al., 2016). Alrededor del 80% de los productos HEP disponibles en el mercado se basan en los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* (But et al., 2016; de Faria y Wraight, 2007). Estos géneros están conformados por diferentes especies que en el transcurso del tiempo han ido aumentando debido a los nuevos aislamientos que se realizan en todo el mundo y al empleo de técnicas moleculares que permiten su identificación de forma certera y concluyente.

Los hongos entomopatógenos no sólo controlan naturalmente las poblaciones de artrópodos, sino que también forman complejas relaciones con las plantas. Se ha demostrado que las especies de HEP, *M. robertsii* y *B. bassiana*, proporcionan a las plantas parte del nitrógeno que ellos asimilan durante la parasitación de insectos (Behie y Bidochka, 2014; Litwin et al., 2020), promoviendo el crecimien-

to de estas (Ríos Moreno et al., 2016). *Beauveria bassiana* actúa como endófito (coloniza el interior de las plantas) de aproximadamente 25 especies de plantas, contribuyendo al control de plagas y hongos fitopatógenos (McKinnon et al. 2017; Litwin et al., 2020; Vega, 2018). Coloniza hojas y brotes, además de las raíces, permitiendo que las plantas sean más resistentes a los insectos (Klieber y Reineke 2016; Litwin et al., 2020), y también las protege de los patógenos microbios.

2.1. Historia

El género fúngico mayormente estudiado por su acción entomopatógena es *Beauveria* sp. Su actividad entomopatógena fue inicialmente descrita en 1835 por el italiano Agostino Bassi di Lodi. Él observó una enfermedad en los gusanos de seda, *Bombyx mori*, que llamó "muscardina blanca" y comenzó con los primeros experimentos de infección, demostrando por primera vez que un hongo puede causar una enfermedad en insectos. Posteriormente, *Beauveria* sp. fue estudiada por el naturalista italiano Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivell, quien le dio nombre de *Botrytis bassiana* en honor a Bassi. En 1912, Vuillemin creó el nuevo género *Beauveria* en honor a al micólogo Jean Jules Beauverie, del cual la especie tipo es *Beauveria bassiana* (Zimmermann, 2007). Por otra parte, *Metarhizium anisopliae* fue el primer hongo del mundo en ser producido de forma masiva para el control de plagas de insectos (Roberts y Leger, 2004).

Las primeras pruebas de campo innovadoras con HEP las realizó un microbiólogo ruso, Elie Metchnikoff en 1888, quien más tarde se convirtió en ganador del Premio Nobel. Metchnikoff produjo conidias fúngicas en un sustrato esterilizado y lo combinó con gránulos de arena para esparcirlos en cultivos de campo (Lord 2005, Maina et al., 2018). Aunque los resultados fueron inconsistentes, el trabajo de Metchnikoff despertó la curiosidad en todo el mundo y condujo a programas en Europa y Estados Unidos para la experimentación con HEP (Lord 2005; Maina et al., 2018).

Los estudios sobre HEP disminuyeron después de la Segunda Guerra Mundial, cuando los insecticidas químicos sintéticos estuvieron disponibles para el control de plagas de insectos. En estas últimas tres décadas el estudio y aplicación de HEP en el control biológico está incrementando en gran medida debido a una mayor conciencia ambiental, preocupaciones de seguridad alimentaria y al fracaso de los productos químicos convencionales debido a un número creciente de especies resistentes a los insecticidas (Maina et al., 2018).

2.2. Mecanismo de acción

En este capítulo nos evocaremos a revisar el mecanismo de acción que han desarrollado los HEP para parasitar a los insectos. Para que ocurra este proceso se requiere que el HEP se diferencie en estructuras celulares que son morfológicamente diferentes, las cuales son: conidia (**Figura 1a**), tubo germinativo, apresorio (**Figura 1b**), hifa (**Figura 1c**) y blastosporas (**Figura 1d**). Estas estructuras participan en las siguientes etapas claves del proceso de infección y parasitación del insecto (**Figura 2**): (a) Adhesión de las conidias a la cutícula del huésped, (b) formación del tubo germinal, (c) diferenciación del tubo germinal en una estructura llamada apresorio, (d) penetración del apresorio en el interior de la cutícula del insecto, (e) colonización del hemocele (sistema circulatorio del insecto) por blastosporas, (f) emergencia de las hifas del HEP desde el interior del insecto, (g) esporulación del HEP sobre el cadáver del insecto, promoviendo de este modo la dispersión de las conidias y el comienzo de una nueva infección. En la **Figura 3** se ilustra la capacidad de las cepas HEP, empleadas en el proyecto “Desarrollo de un pesticida en base a hongos entomopatógenos para el biocontrol y/o manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides como una alternativa sustentable en el cambio climático, PYT-2017-0182” en penetrar el capullo de las pupas de *Lobesia botrana* en estado de diapausa (**Figura 3**) (Altimira et al., 2019).

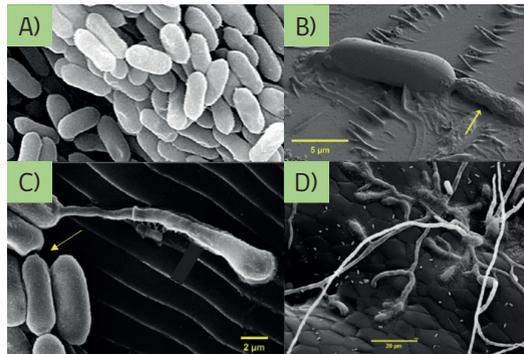


Figura 1. Diferentes estructuras y morfologías celulares de los hongos entomopatógenos. A) conidias. B) apresorio (flecha en amarillo). C) blastosporas (flecha en amarillo) en el interior del hemocele. D) micelio (Adaptado de Butt et al., 2016).

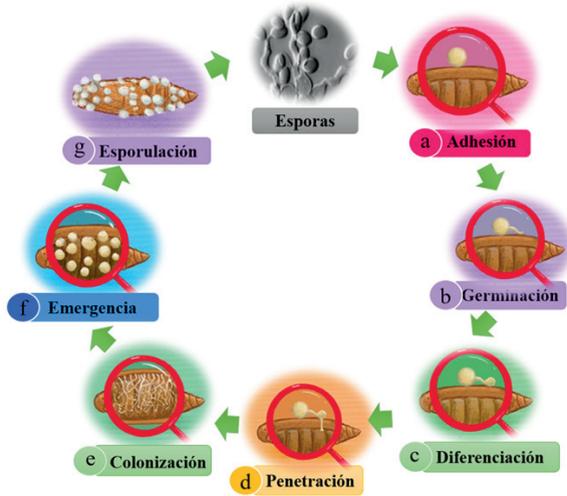


Figura 2. Ciclo de infección y desarrollo de un hongo entomopatógeno (HEP), sobre una pupa de insecto. Secuencialidad de los pasos de infección y colonización, desde la adhesión de la espora a la cutícula o capullo de la pupa hasta la emergencia del hongo. (Ilustrado por Carlo Cortés).

	Capullo + pupa	Capullo	Pupa	Pupa disectada	Interior	Cutícula teñida
Sin HEP						
Con HEP						

Figura 3. Imágenes representativas de colonización de HEP en pupas con capullo de *L. botrana*. En la primera fila, se muestran imágenes de una pupa del tratamiento control y en la fila inferior es de una pupa tratada con HEP. Ambas pupas se disectaron. Las hifas que penetraron la cutícula de la pupa se tiñen con azul de lactofenol (Adaptado de Altimira et al., 2019).

A continuación, se describe con mayores detalles las principales etapas que comprenden la infección y parasitación de los insectos por los HEP:

2.2.1. Adhesión y penetración del HEP sobre la cutícula del insecto

Tal como se mencionó previamente, el primer paso en el proceso de infección es la adhesión de las conidias del HEP a la superficie del huésped (**Figura 2**). Dado que la mortalidad depende de la dosis es vital que la mayor cantidad de conidias se adhieran a la cutícula (Butt et al, 2016). La superficie de las conidias de los HEP hipocreales está cubierta por una capa compuesta de proteínas de naturaleza hidrofóbica que facilitan la unión pasiva de estas a las superficies de la cutícula de los artrópodos (Holder y Keyhani, 2005) (**Cuadro 1**). Adicionalmente, los HEP secretan enzimas líticas tales como proteasa, lipasas y quitinasas, cuya principal función es la hidrólisis de los componentes de la cutícula del insecto, facilitando la penetración del apresorio hacia el interior de los artrópodos. También secretan la enzima fosfolipasa C que hidroliza los enlaces fosfodiéster de los fosfolípidos de las membranas celulares de los insectos, permitiendo que el hongo ingrese al hemocele e infecte sus tejidos (Santi et al., 2010). En la **Cuadro 1** se mencionan los genes y sus funciones en la cascada de eventos que ocurren en el proceso de parasitación de los insectos por los HEPs.

2.2.2. Post-penetración y multiplicación del HEP en la hemolinfa del insecto

Una vez que el HEP invade la hemolinfa, se multiplican como blastosporas. Este tipo de estructura celular fúngica ofrece una gran relación superficie/volumen para la absorción de nutrientes. Las blastosporas colonizan rápidamente el hemocele, donde se encuentran con las defensas celulares y humorales del huésped y presión osmótica elevada (300 a 500 mOsmol / l). En el hemocele, las blastosporas secretan la enzima trehalasa ácida (ATM1) que hidroliza la trehalosa (principal carbohidrato de la hemolinfa) para su nutrición. Ante la invasión de los HEPs, los insectos han desarrollado receptores de reconocimiento de patógenos (RRP). Los RRP se expresan constitutivamente y se secretan en la hemolinfa o se presentan en la superficie de los hemocitos (células que se encuentran en el hemocele), en el cuerpo graso y las membranas plasmáticas de las células epidérmicas. Los RRP se unen a restos de azúcar u otros ligandos que se encuen-

tran en las superficies de las células de los HEPs para facilitar la eliminación del microbio mediante fagocitosis (**Figura 4**). Adicionalmente, las células de los insectos pueden producir una amplia gama de defensas humorales para resistir la infección por hongos (**Figura 4**). Esto incluyen la producción de lectinas, inhibidores de la proteasa, fenoloxidasas, péptidos antimicrobianos y radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno (Jiang et al., 2010) (**Figura 4**). Concomitantemente, los HEPs han desarrollado estrategias para minimizar el impacto de las defensas inmunes del huésped (**Figura 5**), que incluyen la represión de las proteasas que activan la fenoloxidasa, la eliminación de los carbohidratos de la superficie inmunogénica que son reconocidos por el sistema inmune del insecto, la secreción de inmunomoduladores y la capacidad de tolerar los péptidos antimicrobianos secretados por el huésped (**Figura 5**). *M. anisopliae* secreta una proteína de evasión inmune similar al colágeno, MCL1 (Wang y St. Leger, 2006). La interrupción de MCL1 aumenta el ataque de las blastosporas por parte de los hemocitos y reduce la virulencia (Wang y St. Leger, 2007). La función de MCL1 es actuar como una “capa” protectora antiadhesiva que enmascara los componentes antigénicos de la pared celular (β-glucanos). Adicionalmente, los HEPs secretan abundantes compuestos orgánicos de menor masa molecular llamados metabolitos secundarios. Estos son necesarios tanto para suprimir el sistema de defensa del insecto como para impedir que los microorganismos oportunistas se propaguen (Donzelli y Krasnoff, 2016). Los metabolitos secundarios que producen los HEP del género de *Beauveria* son bassianina, bassiacridina, bassianólido, tenellina y oosporeína, mientras que los HEP pertenecientes al género *Metarhizium* producen ciclosporina, swainsonina y destruxinas (Butt et al., 2016). Algunos metabolitos bioactivos son inmunomoduladores que limitan el impacto de las defensas del huésped y permiten al hongo colonizar y generar biomasa con relativa facilidad, lo que conducirá a la producción de conidias necesarias para la dispersión y la supervivencia. También estos compuestos tienen actividad antimicrobiana para excluir bacterias y hongos saprófitos oportunistas. Algunos compuestos secretados por los HEP son multifuncionales. Por ejemplo, las hidroxifungerinas producidas por especies de *Metarhizium* tienen actividad antibiótica e insecticida (Uchida et al., 2005). Del mismo modo, la miriocina producida por el HEP, *Isaria sinclairii*, funciona como un antibiótico y supresor inmune (de Melo et al., 2013). La producción de compuestos con funciones duales o múltiples asegura la colonización eficiente del huésped.

2.2.3 Emergencia y esporulación del HEP

Cuando el insecto ha muerto y los nutrientes en el hemocele se agotan, el hongo debe crecer fuera del insecto para producir y dispersar sus conidias (**Figura 5**). Las blastosporas que aún circulan en el hemocele se diferencian a la estructura de hifas, las cuales emergen hacia el exterior del insecto para la posterior esporulación en la superficie del huésped (Butt et al., 2016).

Las principales ventajas de estos hongos como biocontroladores son (Cañedos y Ames, 2004):

1. Presentan grados variables de especificidad, pueden ser específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas.
2. Si el HEP encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, es decir, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.
3. Se pueden aplicar mezclas de HEP con dosis subletales de insecticidas, para lograr efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado.
4. No contaminan el medio ambiente ni afectan al hombre u otros animales superiores.

Las desventajas que presentan son (Cañedos y Ames, 2004):

1. Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivos en la formulación (protectores solares, aceites y antidesecantes).
2. Requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar que pierdan su patogenicidad.
3. En general, los insecticidas biológicos no matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente. Sin embargo, el insecto deja de ser plaga al ser parasitado por el hongo, deja de alimentarse mucho antes de morir, disminuyendo el daño.

Cuadro 1. Genes de virulencia involucrados en HEP. (Adaptado de Butt et al., 2016)

Grupo funcional	Genes	Descripción
Adhesión a la cutícula	Mad 1, Mad 2 Hyd 1, Hyd 2, Hyd 3 SsgA cwp 10	Proteínas-tipo adhesina Hidrofobinas Proteínas tipo hidrofobinas Incrementa la hidrofobicidad de las esporas.
Degradación de cutícula	Pr1, Pr2, Pr4 chi 1, chi 2, chi 3, chi 4 Bbchit 1, Bbchit 2	Subtilisina, tripsina y cistein proteasa Quitinasas
Manejo del estrés	HSP25, HSP30, HSP70, HSP90 Hog1, Pmr1	Proteínas de shock térmico Proteína quinasa activada por mitógeno
Adaptación a la hemolinfa/ inmunomodulación	Mos 1 Mcl 1 Mr-npc2a dtxS1-dtxS4	Osmosensor Proteína tipo colageno Carrier de esterol Biosíntesis de dextruxinas
Multifactorial (Factores de transcripción)	MrpacC MrSkn7 cag8	Degradación de la cutícula Micosis de los cadáveres de insectos Evasión de la inmunidad Formación de apesorio Biosíntesis de pared celular Evasión de la inmunidad Síntesis de hidrofobina
	BbMF1 MaPKA1 <i>nrr1</i> Crr1 Mest1 ATM1 MrGAT	Crecimiento micelial Producción de blastosporas Regulación de la esporulación Tolerancia al estrés oxidativo, osmótico y térmico. morfogénesis de las hifas Degradación de la cutícula Adquisición de nutrientes Respuesta a la regulación del nitrógeno Regulador del carbono Hidrólisis de almacenamiento de lípidos Metabolismo de lípidos Enzima de hidrólisis de la trehalosa Biosíntesis de triacilglicerol

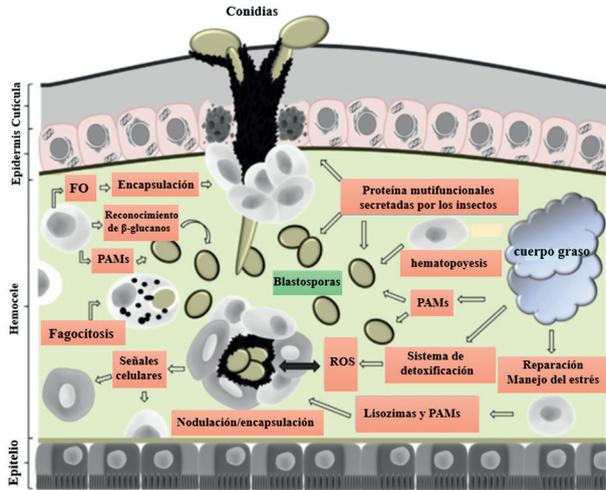


Figura 4. Respuestas celulares y humorales de los insectos a los hongos entomopatógenos. Las células de HEP en la hemolinfa son reconocidas por los hemocitos y los receptores solubles. Los hemocitos fagocitan y encapsulan las blastosporas, el insecto secreta proteínas multifuncionales y compuestos bioactivos para inmovilizar y matar el hongo. Las blastosporas activan redes de respuesta, para el control del estrés junto con compuestos antioxidantes. FO, feniloxidasas; PAMs, péptidos antimicrobianos; ROS, especies reactivas de oxígeno (Adaptado de Butt et al., 2016).

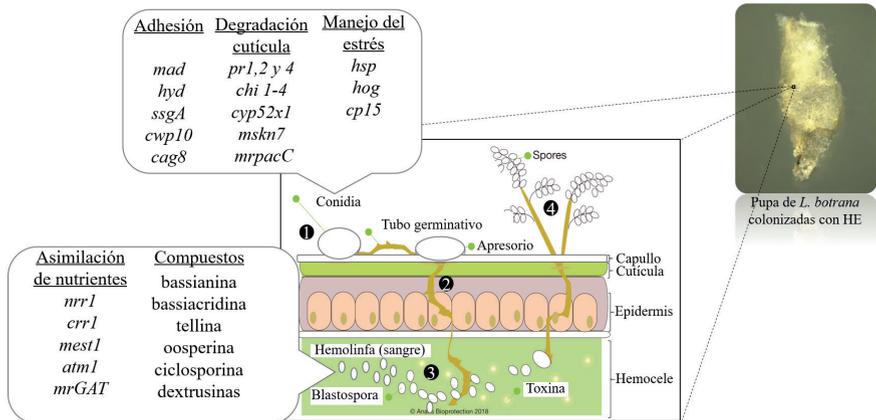


Figura 5. Ilustración del mecanismo de acción insecticida de los hongos entomopatógenos. Se ilustran las etapas de infección de los HEP tales como adhesión (1), penetración (2), colonización (3) y emergencia (4) junto con los genes que participan en la adhesión y que codifican las enzimas de degradación cuticular, manejo de estrés y asimilación de nutrientes, además de los metabolitos secundarios que secretan al interior del insecto, secretan al interior del insecto (Adaptado de Butt et al 2016 y Ramírez et al., 2018).

3. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria entomopatógena, con forma de bastón, Gram positiva, formadora de esporas y aeróbica que se encuentra generalmente en el suelo, granos de polvo, insectos muertos y agua (Lambert y Pefe-roen, 1992). Los biopesticidas en base a Bt son los más utilizados en el mundo, debido a su toxicidad hacia una amplia gama de plagas de insectos como Diptera, Lepidoptera y Coleoptera (Federici *et al.*, 2006; Lacey *et al.*, 2015) y a su inocuidad hacia el ser humano.

3.1. Historia

La era de Bt se inició en 1901, cuando el científico japonés, Shigetane Ishiwata, aisló una bacteria de las larvas de gusanos de seda muertos mientras investigaba la causa de la llamada "enfermedad de sotto" (enfermedad de colapso repentino). La enfermedad fue responsable de la pérdida de un gran número de gusanos de seda en Japón y la región circundante. Ishiwata denominó a la bacteria causante de la enfermedad *Bacillus sotto* (Ibrahim *et al.*, 2010).

Unos años después, el científico alemán Ernst Berliner aisló una cepa relacionada en larvas de polilla mediterránea muerta que encontró en un molino de harina en el estado alemán de Turingia, denominándola en el año 1915, *Bacillus thuringiensis* (Milner, 1994). Berliner estudió la bacteria y encontró cuerpos de inclusión o "Restkörper" junto con la endospora (Roh *et al.*, 2007). Posteriormente, en el año 1953, Thomas Angus demostró la actividad insecticida de estos cuerpos altamente refráctiles, denominándolos, "cristales parasporal". Thomas Angus junto con Philip Fitz-James y Christopher Hannay descubrió en 1955 que estos cristales tóxicos eran proteínas. Las cuales recibieron el nombre de proteína Cry.

El primer insecticida comercial basado en Bt (Sporine) se produjo en Francia en 1938 y se empleó principalmente para controlar las polillas de la harina. En los Estados Unidos, Bt se fabricó comercialmente por primera vez en 1958 y, se registró en 1961 en la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (Roh *et al.*, 2007). A pesar de que los productos desarrollados en base a *Bacillus thuringiensis* se intensificaron en los años 50, solamente en 1970 se masificó la comercialización de la cepa *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 en varias compañías (Navon *et al.*, 2010). En 1977, Goldberg y Margalit identificaron una cepa que mostraba toxicidad en contra Dipteras. La cepa fue aislada en Israel desde una moribunda larva de *Cules pipiens*, siendo llamada *B.thuringiensis* var. *israelensis*, la cual fue la

primera bacteria usada en programas de control biológico en contra de Dipteras en el mundo.

Actualmente, los biopesticidas en base a *Bacillus thuringiensis* y proteínas dan cuenta del 90% del mercado de control biológico. En las últimas décadas se han identificado más de 700 secuencias de genes cry que codifican proteínas cristalinas (Cry). Si bien muchas proteínas Cry tienen propiedades insecticidas para el control de plagas en la agricultura, otras proteínas producidas como cristales parasporales por cepas Bt no tienen actividad insecticida conocida y se han denominado parasporinas. Algunos de este grupo de parasporina de proteínas Cry, tales como Cry31A, Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry63A y Cry64A, exhiben una actividad citotóxica fuerte y específica contra células cancerosas humanas de diversos orígenes y se les ha dado los nombres alternativos parasporin-1 (PS1), parasporin-3 (PS3), parasporin- 4 (PS4), parasporina-2 (PS2), parasporina-6 (PS6) y parasporina-5 (PS5), respectivamente. Además, los aislados de Bt también pueden sintetizar otras proteínas insecticidas durante la fase de crecimiento vegetativo; estos se secretan posteriormente en el medio de cultivo y se han designado como proteínas insecticidas vegetativas (Vip-9) y la proteína insecticida secretada (Sip) (Palma et al., 2014).

El cristal Bt (**Figura 6**) y las otras toxinas solubles secretadas son altamente específicas para los diferentes ordenes de insectos (Lepidóptera, Diptera, Hemiptera, etc) adquiriendo importancia mundial como alternativa a los insecticidas químicos (**Figura 7**). La utilidad de estas proteínas insecticidas también ha motivado la búsqueda de nuevos aislados de Bt de los hábitats más diversos para identificar y caracterizar nuevas proteínas insecticidas con diferentes especificidades. Algunos de estos aislamientos muestran actividades tóxicas novedosas e inesperadas contra organismos distintos de los insectos, lo que sugiere una naturaleza pluripotencial de algunas toxinas (Palma et al., 2014).

3.2. Mecanismo de acción

La actividad insecticida de las mayorías de las subespecies de Bt están relacionadas a la producción de una inclusión de una estructura de cristal llamada-endotoxina, la cual es sintetizada durante la esporulación y está asociada a la espora (Vontersch *et al.*, 1994). Dependiendo de la variedad de especie, la-endotoxina está compuesta de diferentes estructuras y masa molecular (27 a 160 kDa). Estas proteínas (protoxinas) son llamadas proteínas Cry y presentan diferentes grados de toxicidad sobre varios ordenes de insectos susceptibles

(Palma et al., 2014). Cuando la larva ingiere, estas inclusiones, las protoxinas son solubilizadas y son convertidas en toxinas activas de baja masa molecular por las enzimas del insecto (proteasas) en el pH alcalino del estómago de la larva. Las toxinas se unen a receptores específicos, e inducen a la formación de poros en la membrana plasmática de las células intestinales provocando la pérdida de la integridad de la membrana. Tales eventos conducen a la lisis celular y finalmente a la muerte del insecto por inanición y sepsis (Kumar *et al.*, 2006) (Figura 8).

Figura 6

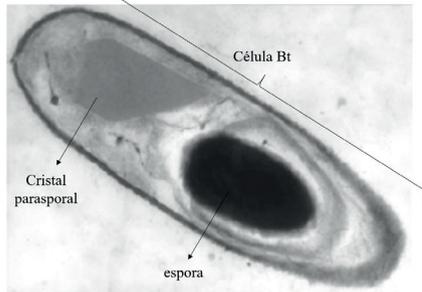


Figura 6. Micrografía electrónica de transmisión de una sección longitudinal de Bt. Se observa la espora (estructura ovoide negra) y el cristal de proteína con propiedades insecticidas (inclusión bipiramidal) (Adaptado de Sanchis y Bourguet, 2008).

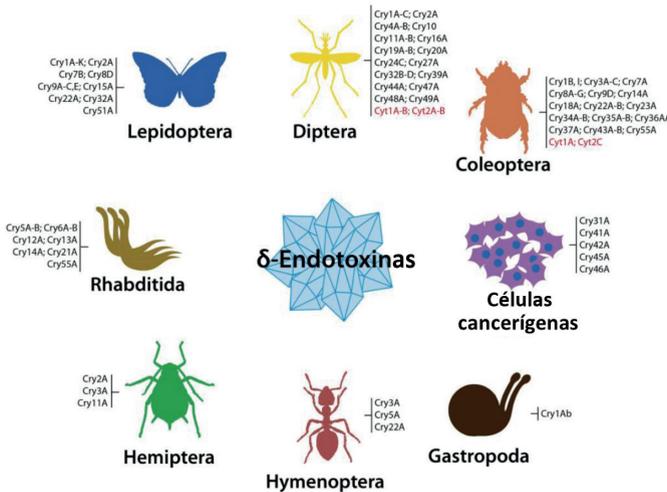


Figura 7. Especificidad de acción insecticida de las o-endotoxinas producidas por Bt. (Adaptada de Palma et al., 2014).



Figura 8. Actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* sobre una larva de *L. botrana*. Se indican con las flechas la secuencialidad de la acción de *B. thuringiensis* y su toxina Cry. (Ilustración realizada por Carlo Cortés).

4. Bibliografía

Altimira F, De La Barra N, Rebufel P, Soto S, Soto R, Estay P, Vitta N, Tapia E. 2019. Potential biological control of the pupal stage of the European grapevine moth *Lobesia botrana* by the entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* in the winter season in Chile. BMC Res Notes 12:548.

Behie SW, Bidochka MJ. 2014. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. Appl Environ Microbiol 80:1553-1560.

Butt TM, Coates CJ, Dubovskiy IM, Ratcliffe NA. 2016. Chapter nine-entomopathogenic fungi: New insights into host-pathogen interactions. Advances in Genetics. 94:307-364.

Cañedo V., Ames T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.

de Faria MR; Wraight, SP. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control. 43:237-256.

de Melo NR, Abdrahman A, Greig C, Mukherjee K, Thornton C, Ratcliffe NA, Vilcinskis A, Butt, TM. 2013. Myriocin significantly increases the mortality of a non-mammalian model host during *Candida* pathogenesis. PLoS One. 8:e78905. 19

Donzelli BGG, Krasnoff SB, Churchill ACL, Vandenberg DMG. 2010. Identification of a hybrid PKS-NRPS required for the biosynthesis of NG-391 in *Metarhizium robertsii*. Curr Genet. 56:151-162. Federici BA, Park HW, Sakano Y. 2006. Insecticidal protein crystals of *Bacillus thuringiensis*, in Inclusions in Prokaryotes, ed Shively J. M., editor. (Berlin; Heidelberg; Springer-Verlag) 195-235.

Goldberg LJ, Margalit JA. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News.37: 355-358.

Holder DJ, Keyhani N O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. Applied and Environmental Microbiology. 71:5260e5266.

Ibrahim MA1, Griko N, Junker M, Bulla LA. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioeng Bugs*. 1:31–50.

Jiang H, Vilcinskas A, Kanost M R. 2010. Immunity in lepidopteran insects. In *Invertebrate immunity* (pp. 181e204). US: Springer.

Klieber J, Reineke A. 2016. The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. *J Appl Entomol*. 140:580–589.

Kumar PA, Sharma RP, Malik VS. 1996. The Insecticidal Proteins of *Bacillus thuringiensis*, *Advances in Applied Microbiology* 42: 1–43.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel M S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr. Pathol*. 132, 1–41. 10.1016/j.jip.2015.07.009.

Lambert B, Höfte H, Annys K, Jansens S, Soetaert P, Peferoen M. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2536–2542.

Litwin A, Nowak M, Różalska S. 2020. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Re/views in environmental science and bio/technology*, 19:23–42.

Lord JC. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J Invertebr Pathol*. 89:19–29.

Maina UM, Galadima IB, Gambo FM, Zakaria D. 2018. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 6: 27–32..

McKinnon AC, Saari S, Moran-Diez ME, Meyling NV, Raad M, Glare T. 2017. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. *Biocontrol*. 62:1–17. Milner RJ. 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture Ecosystems & Environment*. 49:9–13.

Navon, A. 2000. *Bacillus thuringiensis* Insecticides in Crop Protection – Reality and Prospects. *Crop Protection*.19:669–676.

Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. 6:3296 –3325.

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G et al. (2016) Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Sci Technol* 26:1574-1585.

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G, Arroyo-Manzanares N, Arce L, Quesada-Moraga E. 2016. Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol science and technology*. 26:1574-1585.

Roberts DW, Leger RJ. 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol*. 54:1-70.

Roh JY1, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol*. 17:547-559.

Sanchis V, Bourguet D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agron Sustain Dev*. 28:11- 20.

Santi L, da Silva WOB, Berger M, Guimaraes JA, Schrank A, Vainstein MH. 2010. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55(4), 874e880.

Shah FA, Wang CS, Butt TM. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 251:259-266.

Uchida R, Imasato R, Yamaguchi Y, Masuma R, Shiomi K, Tomoda H, Omura S. 2005. New insecticidal antibiotics, hydroxyfungierins A and B, produced by *Metarhizium* sp. FKI-1079. *Journal of Antibiotics*. 58: 804e809.

Vega FE. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*. 110:4-30.

Vontersch, MA, Slatin SL, Kulesza CA, Eglis, G.H. 1994. Membrane permeabilising activities of *Bacillus thuringiensis* Cry IIIB2 and Cry IIIB2 domain I peptide, *Applied and Environmental Microbiology*. 60:3711-3717.

Wang C, Duan Z, Leger RJ. 2008. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell*. 7:302e309.

Wang C, St Leger RJ. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*. 6: 808e816.

Wang C, St. Leger RJ. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 6647e6652.

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocont Sci Technol* 17:553–596.

Capítulo 4

Plaguicidas microbianos en base a hongos entomopatógenos: una alternativa para el manejo integrado de *Lobesia botrana*

Eduardo Tapia R.

Ing. Biotecnología, Dr.

etapia@inia.cl

1. Introducción

El cambio climático ha modificado la pluviometría, temperaturas y gases de la atmósfera, favoreciendo la propagación de la plaga cuarentenaria de la polilla de la vid, *Lobesia botrana* (Vertedor et al., 2010; Reineke 2016). Su larva se alimenta de racimos de viñedos, arándanos y ciruelos, produciendo pudrición y deshidratación de las bayas (Ioriatti et al., 2009). Estudios realizados en el Mediterráneo indican que, por efecto del cambio climático, ha ocurrido un mayor número de vuelos (fenología) y de ciclos reproductivos (voltinismo) de *L. botrana* en las últimas dos décadas (Vertedor et al., 2010). Esta rápida capacidad de respuestas a los cambios climáticos, característico de los lepidópteros, provoca una pérdida de sincronización con sus predadores y parasitoides que podría conllevar a un aumento significativo de la plaga en un corto plazo (Reineke 2016).

Por otra parte, el uso excesivo de agroquímicos para su control contribuye al calentamiento global, debido a la liberación de gases de efecto invernadero en la degradación de estos compuestos en el medio ambiente. Para controlar la propagación de *L. botrana*, que se extiende entre las regiones de Atacama y Araucanía, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) realizó una inversión de \$9.500 M para el suministro de pesticidas y confusores sexuales (Sitio Web SAG). Pese a la implementación de esta estrategia, *L. botrana* aún no ha sido controlada, apareciendo nuevos focos cada año. En base a esto, se generó la necesidad y oportunidad de aunar esfuerzos entre investigadores de Biotecnología, Entomología y Transferencistas del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) con el apoyo del SAG para proponer una nueva estrategia del control de manejo sustentable.

En la actualidad existe una brecha que no está cubierta por el control químico. Esta brecha es el control invernal de esta plaga, mientras se encuentra en diapausa en estado de pupa. Para cubrir y transformarla en una oportunidad de



mitigar la plaga, disminuyendo su número en su primer vuelo, se decidió abarcar este espacio temporal sin actividad por parte de los agricultores. Para esto, propusimos aprovechar los hongos entomopatógenos nativos disponibles en INIA, cuya plasticidad le permitirían ejercer actividad controladora a bajas temperaturas y altas humedades. Las primeras pruebas de concepto fueron realizadas por INIA entre julio y agosto de 2016, en conjunto con el Programa Nacional de *Lobesia botrana* (PNLb), SAG.

Los resultados de las formulaciones iniciales de biopesticida sobre pupas de *L. botrana*, mostraron una eficiente colonización por la cepa nativa *Beauveria pseudobassiana* RGM 1747 en ensayos *in vitro* (Figura 1a y Figura 2). Además, nuestro primer formulado también mostró efectividad en ensayos preliminares de campo (infestación controlada) (Figura 1b y Figura 3) y sectores urbanos (infestación natural) (Figura 1c y Figura 4). Durante este periodo se logró la adhesión, germinación y colonización de la cepa RGM 1747 sobre pupa, demostrando su adaptación a las condiciones climáticas de bajas temperaturas, lluvia, humedad y radiación presentes en esta época del año (Altimira et al., 2019).

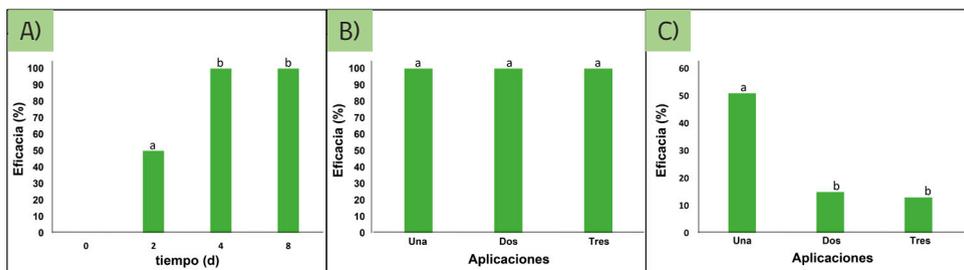


Figura 1. Eficacia de los experimentos en laboratorio, campo y áreas urbanas. A) Eficacia en laboratorio sobre pupas 8 días después de aplicadas (dda). B) Eficacia de aplicación sobre pupas en vides con infestación controlada en campo. C) Eficacia de aplicaciones en sectores urbanos infestados naturalmente. En los casos de b y c, los tratamientos fueron los siguientes: el primer tratamiento fue con una aplicación en el primer día. El segundo tratamiento consistió en dos aplicaciones, una el día 1 y la segunda el día 7. El tercer tratamiento consistió en aplicaciones el día 1, 7 y 14. Cada tratamiento fue revisado 7 días después de aplicado (dda). La evaluación de eficacia se realizó después de 48h a 25°C. El análisis de eficacia de laboratorio fue calculado por el método de Abbott. Las eficacias de infestación controlada y sectores urbanos fueron calculadas por el método de Henderson y Tilton. Las letras en cada gráfico representan la prueba de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$) (Adaptado de Altimira et al., 2019).

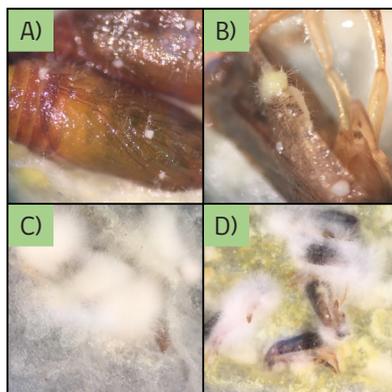


Figura 2. Evaluación en condición *in vitro* de *B. pseudobassiana* RGM 1747 formulada sobre pupas de *L. botrana* A) 25°C y 80% HR. A) y B) muestran la aplicación sobre pupas y polillas respectivamente, En ambos casos, los puntos blancos son microportadores del hongo entomopatógeno. C) y D), los resultados sobre las pupas y polillas respectivamente después de 4 dda, en donde se observa micelio y conidias desarrolladas sobre la plaga.

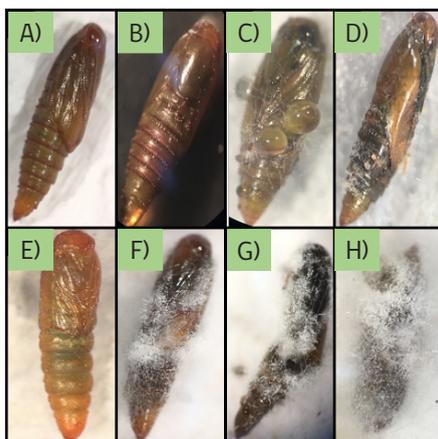


Figura 3. Evaluaciones de campo de formulación de *B. pseudobassiana* RGM 1747. Las fotografías desde la A) hasta la D) fueron tomadas de especímenes de campo expuestos a temperaturas promedio de 9,1°C y 78,3% de HR en Julio/2016. Las fotografías inferiores de E) hasta H) muestran el resultado de la incubación de las pupas por 48h a 25°C después del tratamiento en campo. A) y E) son los testigos sin aplicación. B) y F) corresponden al primer tratamiento de una aplicación. C) y G) corresponden al tratamiento de dos aplicaciones. D) y H) corresponden al tratamiento de tres aplicaciones. En los casos de C) y D), las pupas presentan desarrollo del hongo al ser extraídas del campo post aplicación. De F) hasta H) se aprecia el final desarrollo del HEP sobre las pupas post incubación mostrando su viabilidad post bajas temperaturas.

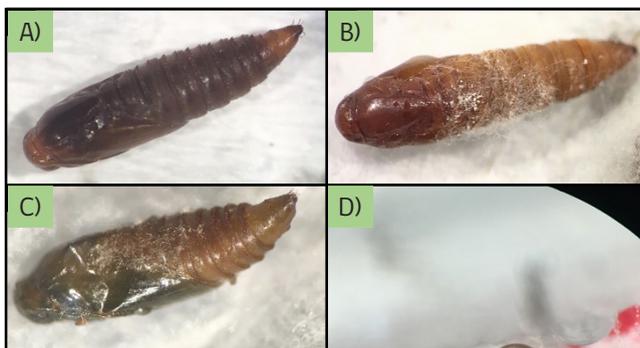


Figura 4. Eficacia en sectores urbanos del formulado de *B. pseudobassiana* RGM 1747 sobre pupas de *L. botrana* en condiciones de infestación natural. La temperatura promedio fue de 10,7°C con un 73,7% de HR en agosto de 2016. Las pupas fueron extraídas de su capullo para capturar las fotografías. A) testigo sin aplicación. B) tratamiento de una aplicación. C) tratamiento de dos aplicaciones. D) tratamiento de tres aplicaciones. todas las pupas, desde B) a D) presentan desarrollo de HEP en su superficie.

Con los antecedentes obtenidos, el proyecto titulado “Desarrollo de un biopesticida en base a hongos entomopatógenos para biocontrol y/o manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides como una alternativa sustentable en el cambio climático PYT-20170182” se postuló a la Fundación para la Innovación Agraria (FIA)

En resumen, como un aporte a la solución del problema de esta plaga, para enfrentar el desafío que nos impone el cambio climático en su contribución en la propagación de *L. botrana*, propusimos el empleo de un biopesticida formulado en base a los hongos entomopatógenos (HEP) *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* nativos que infecten a esta plaga en condiciones invernales, en su diapausa en estado de pupa. Inicialmente, se contempló su aplicación en las vides entre julio y agosto, periodo en el cual no se realiza aplicación de fungicidas. Cabe señalar que, los aislados de HEP utilizados en el proyecto forman parte de la colección del Banco de Recursos Genéticos Microbianos de INIA Quilamapu (Región de Ñuble). Estos aislados, al ser nativos, están adaptados a las condiciones climáticas de nuestro bioma, lo cual es clave en el crecimiento, desarrollo y éxito de estos hongos como biocontroladores (Hussain et al, 2014). Además, los hongos utilizados en este proyecto están en proceso de protección propiedad intelectual (INAPI 20182396), por lo que sólo serán mencionados por su código de trabajo.

Finalmente, la ejecución de este proyecto contempló dos etapas. En la primera se seleccionaron y generaron las tecnologías de producción y formulación de biopesticidas y, en la segunda, se realizaron los ensayos con los agricultores en predios y sectores urbanos para evaluar su eficacia y transferencia cultural del uso de biopesticidas a los involucrados. Con esta estrategia, se propuso el aprovechamiento de los recursos, evaluando los bioinsumos generados y transfiriendo las ideas de un manejo integrado de la plaga.

2. Metodología general

Las cepas obtenidas desde el Banco de Recursos Genéticos Microbianos de INIA fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en medios líquidos y por su eficacia en pupas de *L. botrana*. Después de su formulación, se realizaron ensayos *in vitro* en pulverizadora estática (Potter Tower, Burkard, Inglaterra), simulando las condiciones de campo y finalmente en campo. Los trabajos desarrollados en el proyecto siguieron la línea metodológica descrita en la **Figura 5**.

En un comienzo se suspendieron las esporas de *Beauveria* sp y *Metarhizium* sp. en una solución tampón fosfato con un surfactante para poder realizar un conteo y determinar el número inicial de esporas para inocular y realizar un crecimiento en matraz, que posteriormente fue utilizado como inóculo para su crecimiento final en biorreactor. En este sistema se caracterizaron distintos parámetros como su productividad volumétrica (Q_x [g/(l*h)]), concentración de biomasa (X [g/L]), velocidad específica de crecimiento (μ [h⁻¹]), oxígeno disuelto (OD [%]), revoluciones por minuto (rpm) y unidades formadoras de colonia (UFC), recuento de esporas y blastosporas entre otros.

Después de seleccionar los mejores candidatos de acuerdo a su eficacia y parámetros de productividad, se microformularon en emulsiones inversas con y sin suplementación de una fuentes de energía adicional. La eficacia de estas microformulaciones junto con los tratamientos sin formular, control comercial en base a HEP y testigo (solo agua), fueron evaluadas en condiciones *in vitro* empleando pulverizadora estática para la aplicación sobre pupas de *L. botrana*.

Los aislados formulados que presentaron resultados estadísticamente significativos en su eficacia, determinada por Abbott (1925) en referencia al control comercial y testigo sin aplicación, fueron evaluados finalmente en campo. Con el

apoyo del PNLb del SAG, se realizaron pruebas en las regiones Metropolitana, del Libertador Bernardo O`Higgins y Valparaíso. Las pruebas de eficacia fueron bloques al azar con un tratamiento de producto biológico en base a HEP comercial y un testigo sin aplicación. La eficacia fue determinada por Henderson y Tilton (1955) y, adicionalmente, en algunos sectores se pudo implementar la estrategia de registro de capturas utilizando la metodología del PNLb del SAG. Complementariamente, se realizaron ensayos de eficacia con *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* comerciales para el control de larvas para mejorar la protección del cultivo de vid contra *L. botrana* bajo el protocolo de evaluación de productos vigente del PNLb del SAG.

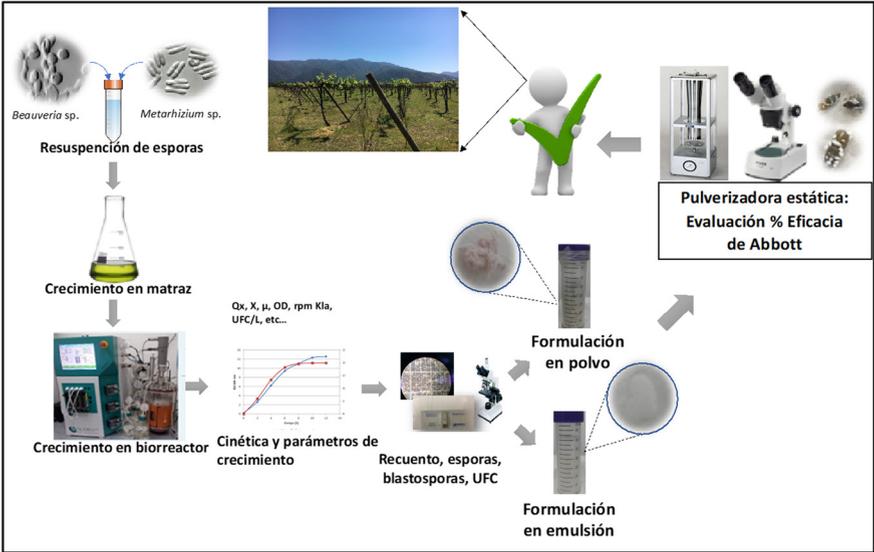


Figura 5. Esquema general de metodologías de trabajo del proyecto en: producción y evaluación de bioinsumos.

3. Resultados

3.1. Resultados de laboratorio, pulverizadora estática:

Los resultados de la eficacia *in vitro* sobre pupa de los tratamientos con cepas del género *Beauveria* se presenta en la Figura 6. Luego de los 6 dda, los tratamientos M8F2 y M4F2 (ambos con fuente de energía adicional) alcanzaron el

100% de eficacia sobre pupas. De las etapas anteriores, M8, componente activo de M8F2, fue el que logro las más altas velocidades específicas de crecimiento, X y Q_x , por lo tanto, fue el aislado candidato de *Metarhizium* para producción del biopesticida en ensayos de campo.

En la **Figura 7** se presenta la eficacia *in vitro* de los tratamientos emulsiones inversas. A los 6 dda los tratamientos B4F1 y B1F2, sin y con fuente de energía adicional respectivamente, alcanzaron el 85% de eficacia sobre pupas. De las etapas anteriores, B4, componente activo de B4F1, fue el que logro las más altas velocidades específicas de crecimiento, X y Q_x , por lo tanto, fue el aislado candidato de *Beauveria* para producción del biopesticida en ensayos de campo.

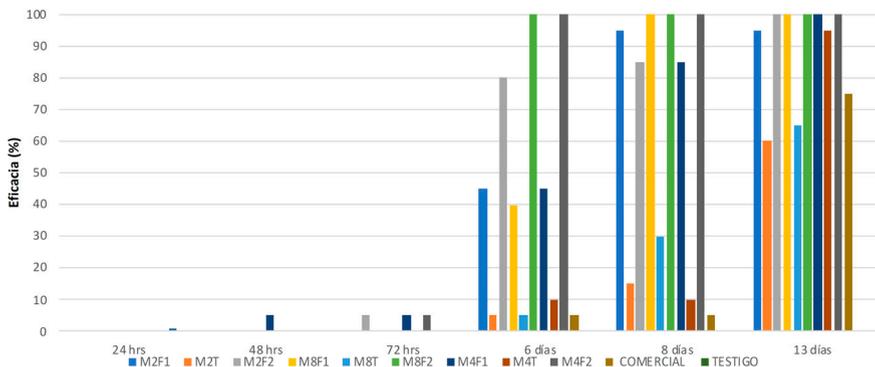


Figura 6. Eficacia de emulsiones inversas de *Metarhizium* sobre pupas de *L. botrana* determinada por el método de Abbott. Cepa M2 tampón (M2T), cepa M2 formulado sin fuente de energía adicional (M2F1), cepa M2 formulado con fuente de energía adicional (M2F2), cepa M4 tampón (M4T), cepa M4 formulado sin fuente de energía adicional (M4F1), cepa M4 formulado con fuente de energía adicional (M4F2), cepa M8 tampón (M8T), cepa M8 formulado sin fuente de energía adicional (M8F1), cepa M8 formulado con fuente de energía adicional (M8F2), control comercial en base a HEP (comercial) y agua (testigo).

Para *Beauveria* (B), los tratamientos fueron:

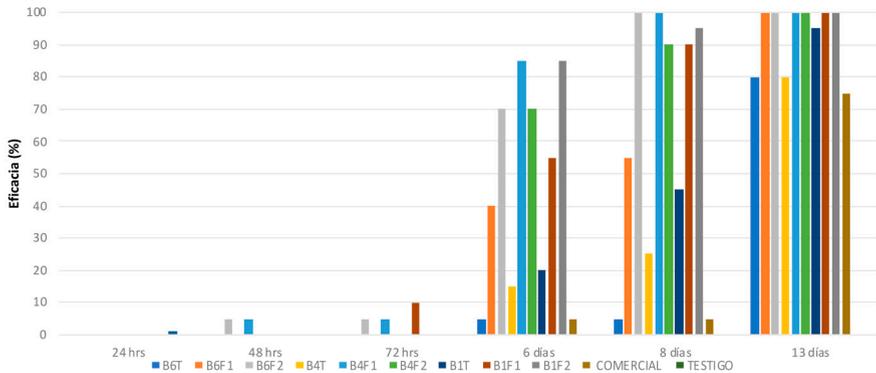


Figura 7. Eficacia de emulsiones inversas de *Beauveria* sobre pupas de *L. botrana* determinada por el método de Abbott. cepa B1 Tampón (B1T), cepa B1 Formulado sin fuente de energía adicional (B1F1), cepa B1 formulado con fuente de energía adicional (B1F2), cepa B4 tampón (B4T), cepa B4 formulado sin fuente de energía adicional (B4F1), cepa B4 formulado con fuente de energía adicional (B4F2), cepa B6 tampón (B6T), cepa B6 formulado sin fuente de energía adicional (B6F1), cepa B6 formulado con fuente de energía adicional (B6F2), control comercial en base a HEP (comercial) y agua (testigo).

La formulación de polvos mojables de las cepas B4 y M8 mostraron una eficacia de 100% y 93% respectivamente a los 7 dda, funcionando en rangos similares de tiempo a las emulsiones inversas con una estabilidad superior. Los resultados de colonización de los HEP formulados como polvos mojables a los 14 dda se muestran en la **Figura 8** y como ejemplo, los efectos de su infección sobre pupas con seda se muestran en la **Figura 9**. Estas formulaciones tipo polvos mojables y emulsiones inversas fueron evaluadas durante la temporada invernal 2018 en las regiones Metropolitana y de O'Higgins.

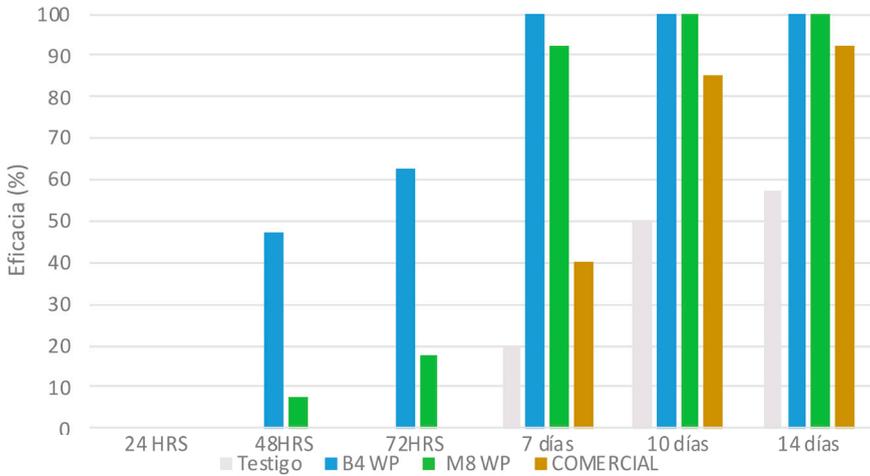


Figura 8. Eficacia de polvos mojables de *Beauveria* y *Metarhizium* determinada por Abbott. Los tratamientos son: *Beauveria* (B4 WP) y *Metarhizium* (M8 WP), Micosplag WP (comercial) y agua (testigo)

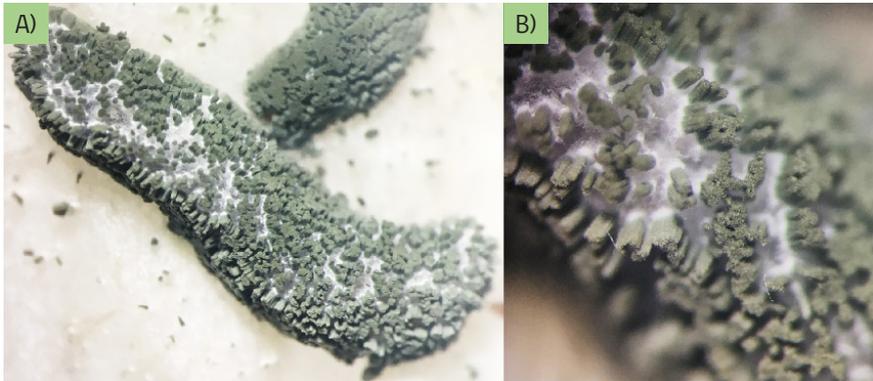


Figura 9. Ejemplo de infección sobre pupa con seda de *Metarhizium* formulado como polvo mojable A) formando esporodocios B).

3.2. Resultado temporada invernal 2018 en regiones Metropolitana y O'Higgins

Después de haber evaluado los aislados candidatos junto a sus distintas formulaciones se procedió a evaluar en temporada invernal, durante junio hasta

agosto, los HEP seleccionados en las regiones Metropolitana y O` Higgins. Con el apoyo del PNLb del SAG se seleccionaron los lugares, buscando sectores urbanos o predios que tuvieran presencia de la plaga. Además, por lo general, todos los sectores se encontraban con monitoreo por trampas con feromona (E7, Z9-Dodecadienil acetato) o con confusión sexual en el caso de los predios productivos, tanto de uva de mesa como para vinificación.

Los resultados que se presentan en la **Figura 10** son las eficacias de los productos tipo polvos mojables (WP) y emulsiones inversas (EI) de los HEP *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* Estos datos representan la epizootia generada por la aplicación de los formulados, incluyendo la micosis de los HEP y hongos ambientales, también llamados oportunistas, estimulados por el formulado y que pudieran complementar la actividad de los HEP.

En la Provincia de Chacabuco, comuna de Lampa, se monitoreó un predio urbano desde abril hasta noviembre de 2018. En este huerto se desarrollaron ensayos durante el período invernal (junio-agosto), donde se aplicaron los plaguicidas microbianos formulados como WP, colectando muestras a los 7, 14 y 21 dda. Las muestras fueron incubadas en placas Petri con humedad hasta 30 días para observar la epizootia. En este ensayo, *Metarhizium* alcanzó una eficacia de un 66.7% post tomada la muestra 21 dda (**Figura 10**).

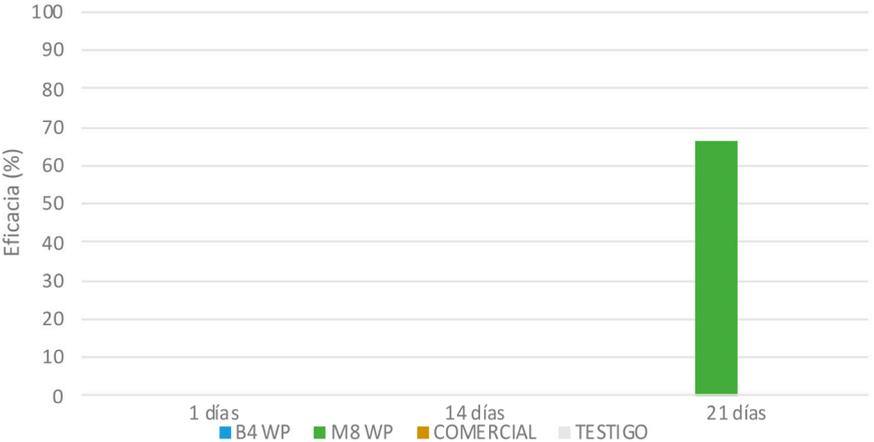


Figura 10. Porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Henderson & Tilton, a los distintos días de revisión de su incubación. Donde M8 WP, *Metarhizium* 8 polvo mojable y B4 WP, *Beauveria* 4 polvo mojable. (región Metropolitana, Lampa, predio urbano) Junio- agosto 2018.

En la Provincia de Santiago, comuna de La Pintana, en un predio rural se desarrollaron ensayos de infestación controlada (Ver **Figura 13C**) con pupas en el periodo de junio-julio, donde se aplicaron los plaguicidas microbianos formulados como WP. Estos fueron revisados a los 7, 14 y 21 dda e incubados hasta 20 d en placas Petri con humedad para observar la epizootia total de los formulados. En este ensayo, los porcentajes de eficacia más altos fueron encontrados a los 21 dda. *Beauveria 4* (B4WP) alcanzó una eficacia de 77.5%, *Metarhizium 8* (M8WP) alcanzó una eficacia de un 75% y el control comercial alcanzó un 55% (**Figura 11**).

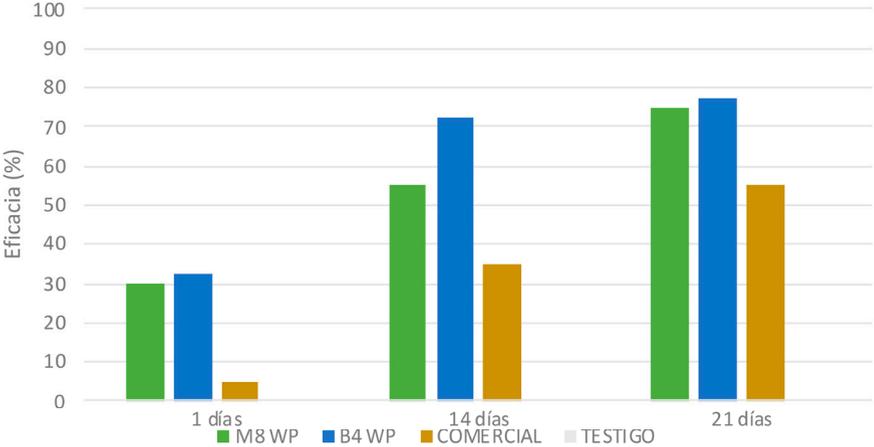


Figura 11. Porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Henderson & Tilton, a los distintos días de revisión. Donde M8 WP; *Metarhizium 8* polvo mojable y B4 WP; *Beauveria 4* polvo mojable (región Metropolitana, La Pintana, predio rural) junio-julio 2018.

Debido a la baja presencia de la plaga en la RM en los sectores monitoreados, se realizaron ensayos adicionales en la región del Libertador Bernardo O'Higgins, en Placilla. El ensayo fue ubicado en un sector de alta infestación en un predio rural, previamente determinado por el PNLb del SAG durante el periodo de junio-julio, donde se aplicaron los plaguicidas microbianos formulados como WP y EI. Los tratamientos fueron revisados a los 7, 14 y 21 dda e incubados hasta 21d en placas Petri con humedad para observar la epizootia. En este ensayo, *Beauveria 4* en su versión de polvo mojable alcanzó un 66.67% de eficacia seguido por el control con un 60% y *Metarhizium 8* con un 57.52% (**Figura 12**).

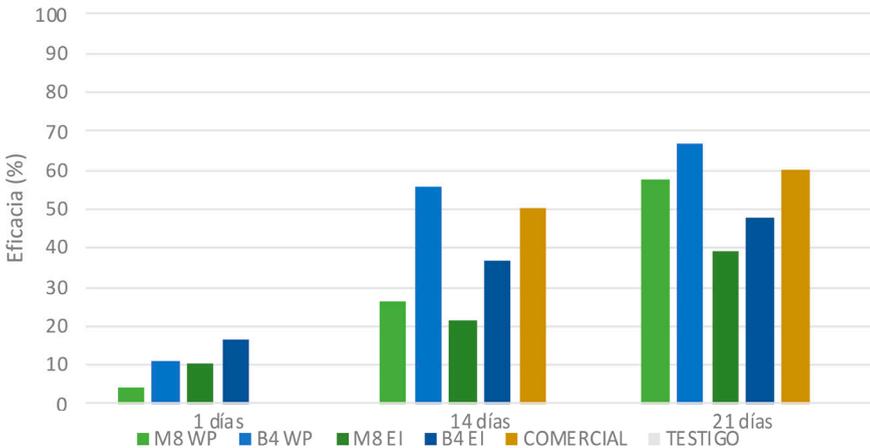


Figura 12. Gráfico de porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Henderson & Tilton, a los distintos días de revisión. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable, B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable, M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa. (región Libertador B. O'Higgins, Placilla, predio rural) junio-julio 2018.

Para complementar estos resultados y previa autorización del SAG, se utilizó la metodología de captura de machos con trampas delta y feromona sexual (E7, Z9-Dodecadienil acetato) post aplicación invernal de los plaguicidas microbianos. En el caso de la experimentación de INIA La Platina (Región Metropolitana), se cerraron las parras en campo con toldos con malla antiáfidos por cada tratamiento y se realizaron las aplicaciones de los formulados en su interior (**Figura 13**). En el caso de Placilla, no se instalaron toldos, aunque se ocuparon las trampas y feromonas.

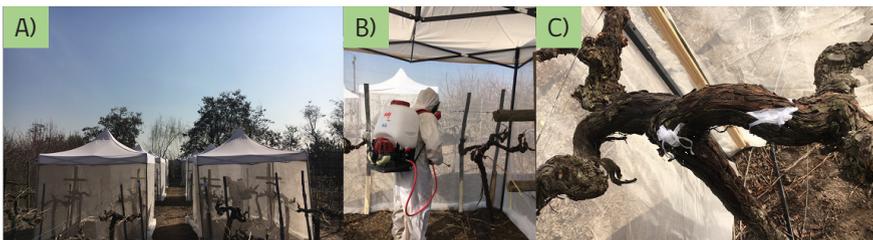


Figura 13. Ensayo de infestación controlada invernal de bioseguridad. A) Repeticiones en campo de toldos con malla antiáfidos completamente cerrados. B) Aplicación de plaguicidas microbianos formulados en base a HEP. c, mallas de tul con pupas con seda insertadas en el ritidomo de las parras. región Metropolitana, La Pintana.

En INIA La Platina, en el campo experimental de fitopatología de uva de mesa Red-Globe, se establecieron las medidas de bioseguridad mencionadas. En este ensayo de infestación controlada contenía 100 pupas con capullo por tratamiento. Los resultados presentados en la **Figura 14**, muestran que el tratamiento que obtuvo menos capturas fue el aplicado con la emulsión de *Metarhizium* 8, seguido por *Beauveria* 4 en sus dos presentaciones, emulsión y polvo mojable. Las capturas post aplicación del producto comercial fueron mayores seguidas por *Metarhizium* 8 polvo mojable y el testigo. En este caso, la alta captura de *Metarhizium* 8 polvo mojable se pueden deber a defectos de instalación de las pupas en el ritidomo, problemas de formulación o aplicación del plaguicida microbiano.

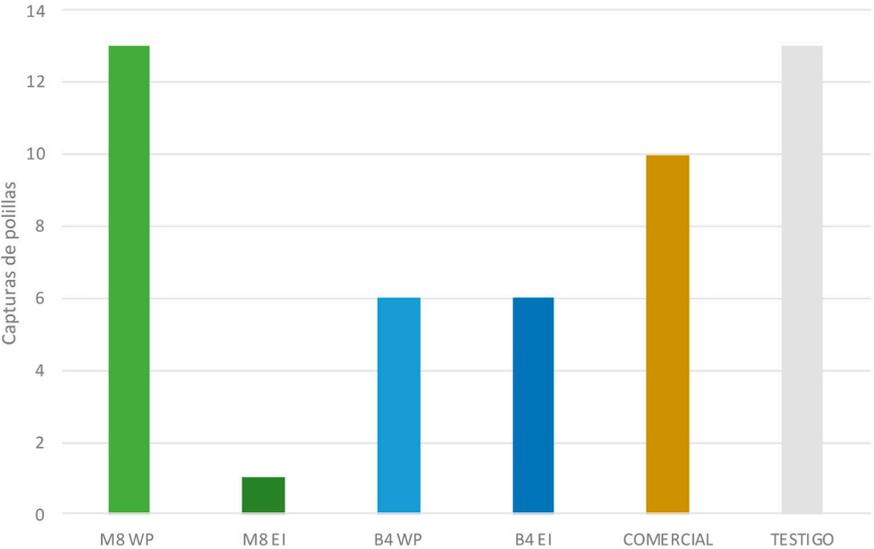


Figura 14. Captura de polillas de *Lobesia botrana* en trampas de feromonas, post aplicación de los tratamientos en INIA La Platina. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable, B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable, M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa (región Metropolitana, La Pintana) Sept.- Oct 2018.

En el Fundo San Luis de Manantiales, Placilla, en la viña con la variedad País, a campo abierto y como se presenta en la **Figura 15**, el tratamiento que obtuvo menos capturas fue el producto comercial seguido por *Beauveria* y *Metarhizium* emulsión respectivamente con una mayor captura por la trampa del SAG (testigo).

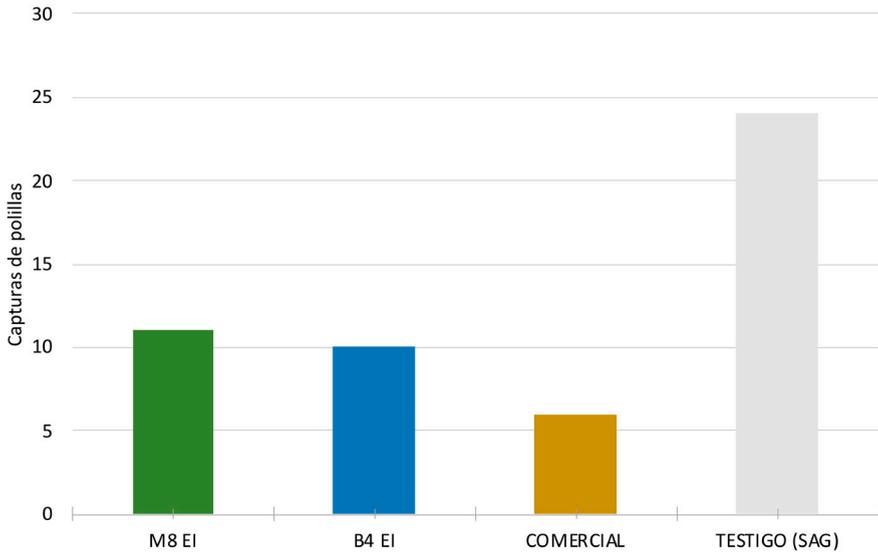


Figura 15. Captura de polillas de *Lobesia botrana* en trampas de feromonas, post aplicación de los tratamientos en Fundo San Luis de Manantiales. M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa (región Libertador B. O’Higgins, Placilla) Sept.- Oct 2018.

3.3. Resultados temporada invernal 2019. Regiones Metropolitana y O’Higgins

A continuación, se presentan los resultados de la temporada invernal 2019 en los mismos sectores evaluados en la temporada invernal 2018.

En la Provincia de Chacabuco, comuna de Lampa, se monitirió un predio urbano desde abril hasta noviembre de 2019. En este huerto se desarrollaron ensayos durante el período invernal/primavera (septiembre-octubre), donde se aplicaron los plaguicidas microbianos formulados como WP, colectando muestras a los 7, 14 y 21 dda. Las muestras fueron incubadas en placas Petri con humedad hasta 30 días para observar la epizootia. La recolección de los 14 dda no se pudo realizar debido a la crisis social en octubre/2019. Finalmente, el tratamiento *Metarhizium* 8 recolectado a los 21 dda alcanzó una eficacia de un 60% (**Figura 16**).

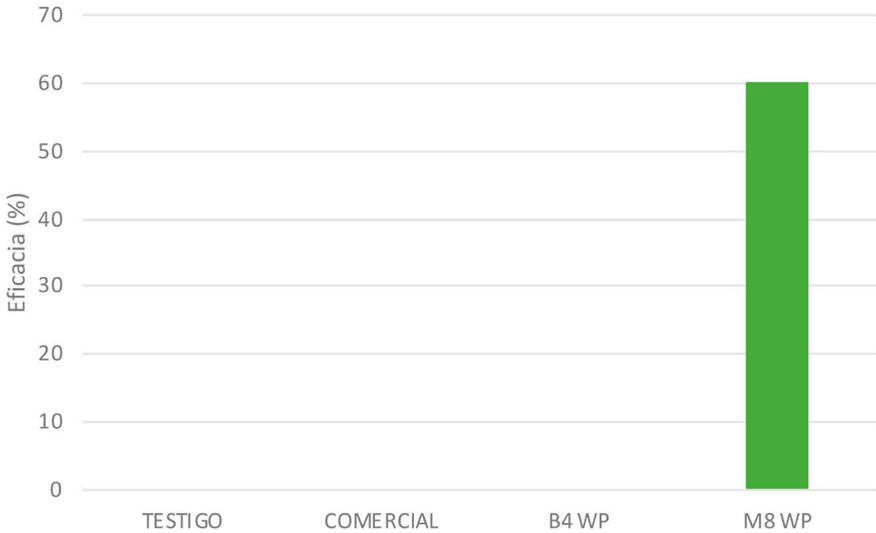


Figura 16. Gráfico de porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Henderson & Tilton, a los distintos días de revisión a los 30d de incubación. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable y B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable. (región Metropolitana, Lampa, predio urbano) septiembre-octubre 2019.

En la Provincia de Santiago, La Pintana, predio rural, se repitió el ensayo de infestación controlada con pupas en el periodo de abril-junio, donde se aplicaron los plaguicidas microbianos formulados como WP y fueron revisados a los 7, 14 y 21 dda e incubados hasta 30d en cajas Petri con humedad para observar la epizootia de los formulados. En este ensayo, los porcentajes de eficacia más altos fueron encontrados a los 21 dda. *Beauveria* 4 emulsión alcanzó una eficacia de 73.3%, *Metarhizium* 8 emulsión alcanzó una eficacia de un 86.7% y el control comercial alcanzó un 26.7% (**Figura 17**).

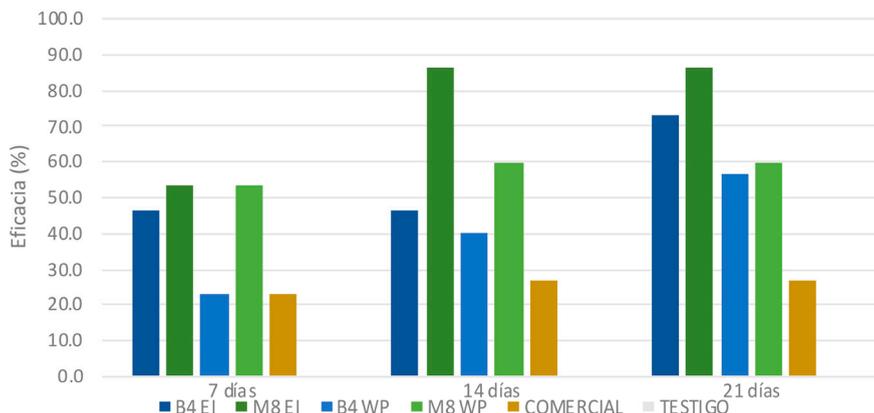


Figura 17. Porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Henderson & Tilton, a los distintos días de revisión. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable y B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable; M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa (región Metropolitana, La Pintana, predio rural) abril-junio 2019.

En Placilla, región Libertador B. O'Higgins, el ensayo fue ubicado en un sector de alta infestación, durante el periodo de abril-junio donde se aplicaron los plaguicidas microbianos formulados como WP y EI. Los tratamientos fueron revisados a los 7, 14 y 21 dda e incubados hasta 21 d en placas Petri con humedad para observar la epizootia. En este ensayo, *Beauveria* polvo mojable alcanzó un 53.49% de eficacia y *Metarhizium* emulsión alcanzó un 80.39% (Figura 18 y 19).

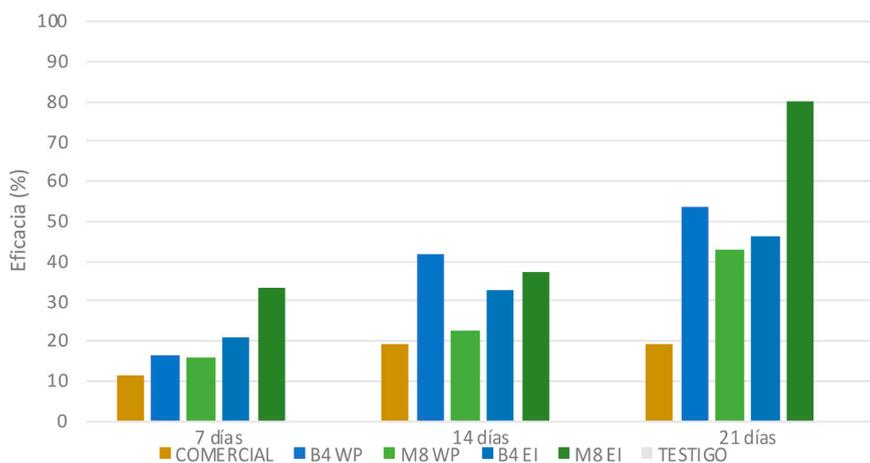


Figura 18. Porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Henderson & Tilton, a los distintos días de revisión. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable y B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable; M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa (región Libertador B. O'Higgins, Placilla, predio rural) abril-junio 2019.



Figura 19. Ejemplo de pupas con seda extraídas de los ensayos de campo de la región de O'Higgins infectadas por plaguicidas microbianos. A) Beauveria. B) Metarhizium.

Las capturas de polillas en INIA La Platina en la temporada invernal 2019 (**Figura 20**) mejoró debido a que *Metarhizium* 8 formulado como emulsión inversa, al igual que el producto comercial, alcanzaron cero capturas indicando que las polillas no volaron debido a la acción del plaguicida microbiano. Esto se puede deber a que las aplicaciones de los plaguicidas microbianos fueron realizadas tempranamente, abril-junio, en donde la seda de la pupa es mas delgada.

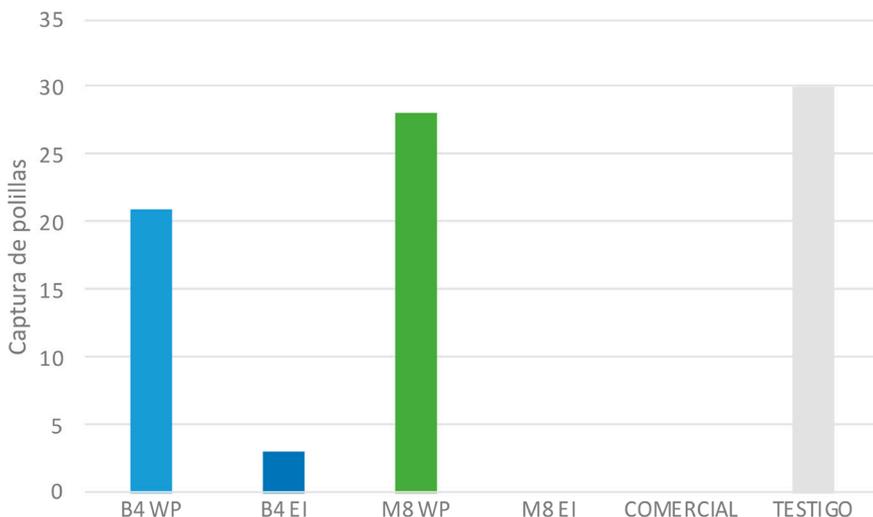


Figura 20. Captura de polillas de *Lobesia botrana* en trampas de feromonas, post aplicación de los tratamientos en INIA La Platina. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable, B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable, M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa (región Metropolitana, La Pintana) Sept.- Oct 2019.

Las mediciones de capturas de Placilla no pudieron ser monitoreadas adecuadamente debido a la crisis social de octubre 2019 porque no pudimos acceder a los sectores en donde se encontraban las trampas en los periodos del ensayo, por lo que no fueron consideradas para esta publicación.

3.4. Resultados temporada invernal 2019. Región de Valparaíso

Adicionalmente en la temporada 2019, en paralelo a obtener los resultados de la temporada invernal de la RM y O´Higgins y en base a los resultados de la temporada 2018, se evaluó en zonas urbanas de Olmué (Región de Valparaíso) la aplicación de *Beauveria* 4 emulsión inversa (EI). En esta ocasión, INIA preparó el plaguicida microbiano y el equipo del PNLb del SAG realizó la mayoría de las aplicaciones invernales en julio/2019. Se evaluó la aplicación de *Beauveria* (B4 EI), *Beauveria* más confusión sexual (B4 EI + CS) y Testigo (Sin aplicación). Para cuantificar el efecto de los tratamientos, se comparó los registros de las capturas de polillas por trampas con feromonas correspondientes a los primeros vuelos de la temporada noviembre 2018 y noviembre 2019. El registro de las capturas en ambas temporadas fue realizado por el PNLb del SAG.

En la temporada de capturas de noviembre 2019, después de los tratamientos invernales con *Beauveria*, se logró reducir en un 34% las capturas de los machos de *L. botrana* solo con B4 EI y un 80% con B4 EI + CS con respecto al testigo en 2019. Al comparar entre temporadas, se destaca el sector aplicado de B4 EI + CS, este valor presenta una disminución de un 89% de la población de *L. botrana*. En el caso de la comparación de temporadas, la aplicada sólo con B4 EI presentó solo un 15% de disminución de la población de polillas. La comparación entre temporadas de los testigos prácticamente no tuvo variación (**Figura 21**).

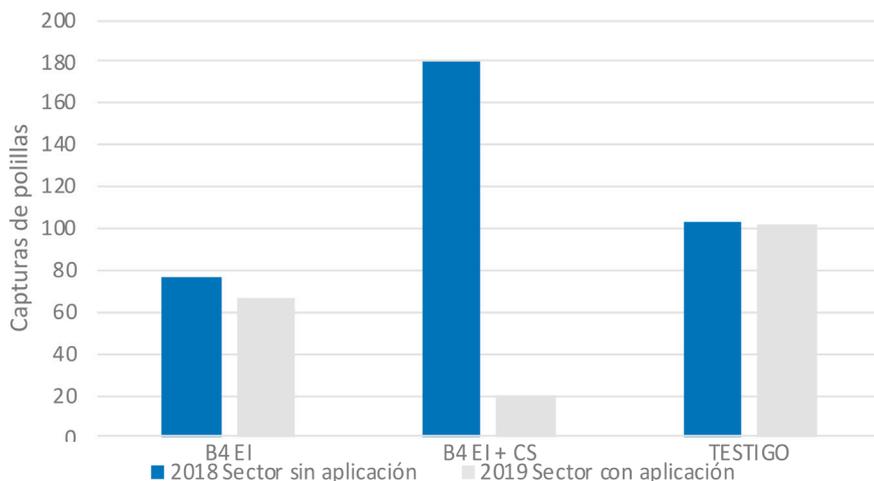


Figura 21. Porcentaje de capturas de machos de *L. botrana* en sector urbano de Olmué. En azul se presentan las capturas 2018. En plomo las capturas 2019. B4 EI, Beauveria 4 Emulsión inversa. CS, Confusión Sexual. TESTIGO, Sector sin aplicación.

Se destaca el efecto sinérgico de la confusión sexual en conjunto a la aplicación de Beauveria 4 WP. Este efecto fue el que obtuvo mayor disminución de captura debido a que ambas estrategias incidieron en el control la plaga. Cabe señalar, no se realizó un tratamiento solo con confusión sexual debido a que no había un mayor número de feromonas disponibles en esa ocasión. Debido a este interesante resultado y en dependencia de nuevos financiamientos en el área, se evaluará una matriz mas compleja para dilucidar de mejor manera la interacción HEP/Feromona/*L. botrana*.

3.5. Resultados *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* para control de larvas: Complemento al control invernal

Adicionalmente, se evaluó una estrategia de control en el periodo de primavera/verano complementarias al control invernal de *L. botrana*. Esta estrategia se basa en las aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) para control de larvas, provenientes de polillas que no hayan sido controladas por las aplicaciones invernales, para establecer un manejo integrado de *L. botrana*. Para prospectar esta alternativa, se evaluaron dos productos comerciales en base a Btk como opciones de manejo. Estas opciones fueron revisadas bajo el protocolo

de evaluación de productos del PNLb SAG. El plaguicida microbiano Btk1 alcanzó una eficacia de 55.6% y Btk2 un 85.6% para control de larvas L1 principalmente (**Figura 22**). En este caso, el rango de acción de los *Bacillus* promedia un 70% de eficacia que sumado al control invernal con HEP proporcionaría un aporte al control de la plaga.

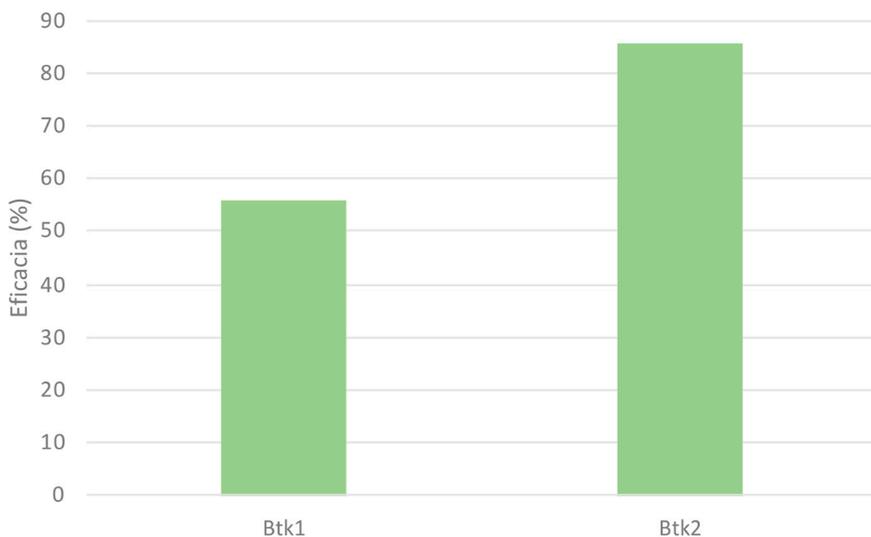


Figura 22. Eficacias de plaguicidas microbianos en base a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en vides.

4. Propuesta de manejo integrado de *Lobesia botrana*

Por los antecedentes presentados en este y otros capítulos, planteamos una propuesta de manejo integrado de *L. botrana* que contempla el uso de hongos entomopatógenos desde abril a agosto y desde esta última fecha realizar aplicaciones de Btk mediante monitoreo de huevos cabeza negra de la plaga. Además, este manejo es compatible con la confusión sexual, aplicaciones de productos químicos en los momentos y dosis correspondientes para el control de esta plaga, otras plagas y enfermedades junto a las liberaciones de enemigos naturales (**Figura 23**).

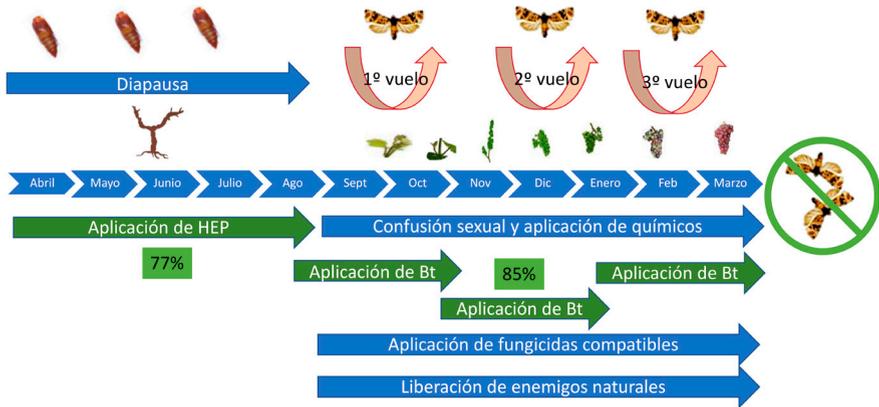


Figura 23. Propuesta de manejo integrado en base a hongos entomopatógenos y *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* para control de distintos estados de *Lobesia botrana*.

5. Conclusiones

Los HEP formulados presentaron mayor eficiencia que los sin formular. Por lo tanto, podemos concluir que la formulación cumple un rol clave en la eficacia del HEP, potenciando el uso de ellos en campo, expuestos a las condiciones naturales tales como las temporadas invernales.

De acuerdo con las observaciones de campo en los monitoreos de la plaga en distintos periodos del año y distintas localidades de las regiones en donde fueron evaluados estos productos, se concluyó que para mejorar la eficacia de los plaguicidas microbianos se deben realizar las aplicaciones de estos productos entre abril-mayo, debido a que el capullo de *L. botrana* es menos densa y las temperaturas no son extremadamente bajas, favoreciendo la actividad de los HEP para el control de la plaga. Esto se refleja en que las eficacias tuvieron aumentos cercanos a un 20% en comparación a aplicaciones posteriores a julio.

Las capturas de polillas a través de trampas con feromonas es una técnica que permite una fácil evaluación indirecta del efecto de los plaguicidas microbianos en base a HEP, complementando los resultados obtenidos en las evaluaciones de eficacia. Por lo tanto, esta técnica es recomendable para monitorear a futuro este tipo de trabajos.

La fuerte presencia de esta plaga en sectores urbanos de nuestro país por la tradición cultural de mantener parras en nuestros jardines propicia el albergue de la plaga en los hogares. Esto plantea la importancia de realizar control urbano de la plaga para que este no sea foco de re-infestación a los predios productivos colindantes. Por lo tanto, el control urbano es clave para el control predial y necesita ser acompañado de medidas culturales y de manejo integrado de plagas.

El manejo integrado de plagas es una alternativa tanto para sectores urbanos como predios productivos, que alcanza porcentajes de control considerables como los mostrados en este proyecto. Nuestra propuesta, se puede adaptar a sectores urbanos utilizando sólo plaguicidas microbianos y enemigos naturales, evitando el uso de productos químicos en sectores donde no existe el conocimiento del manejo de estos o que simplemente no es una opción su uso, por los tiempos de reingreso, carencias o toxicidades entre otros.

Todo este trabajo fue desarrollado en sectores bajo confusión sexual y/o monitoreo del PNLb del SAG. Además, los resultados de las tres regiones en donde se evaluó en una o dos temporadas las aplicaciones de los plaguicidas micro-

bianos en base a HEP, nos llevan a plantearnos preguntas sobre cómo mejorar los plaguicidas y su interacción con las feromonas. Por lo tanto, es una línea de investigación que se debe seguir desarrollando en el país, especialmente con el desplazamiento de los cultivos hacia al sur, producto del cambio climático y que puede ser una oportunidad de agricultura sustentable.

Por los antecedentes mencionados, el desarrollo e implementación de este proyecto se basa en la colaboración integrativa de distintas disciplinas presentes en INIA, como Biotecnología, Entomología y Transferencia Tecnológica que, junto con al apoyo y experiencia del PNLb de SAG y soporte constante de FIA, generaron un factor determinante para el éxito en el biocontrol de *Lobesia botrana* en este proyecto. Ese factor fue la cooperación.

Por ello, aprovecho de agradecer, en nombre de todo el equipo, a todos los agricultores y personas que apoyaron esta iniciativa. Sin ustedes esto no hubiese sido posible.

6. Bibliografía

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*,18, 265-267.

Altimira, F., De La Barra, N., Rebufel, P., Soto, S., Soto, R., Estay, P., Vitta, N., Tapia, E. Potential biological control of the pupal stage of the European grapevine moth *Lobesia botrana* by the entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* in the winter season in Chile. *BMC Res Notes* 12, 548 (2019) doi:10.1186/s13104-019-4584-6.

Henderson, C., F. & Tilton, E., W. (1955). Tests with acaricides against the brow wheat mite, *Journal of Economic Entomology*, 48,157-161.

Hussain A, Rizwan-ul-Hag M, Al-Ayedh H, Al-Jabr AM. 2014. Mycoinsecticides: potencial and future perspective. *Recent Pat Food Nutr Agric* 6:45-53.

Ioriatti C, Anfora G, Angeli G, Mazzoni V, Trona F. 2009. Effect of chlorantraniliprole on eggs and larvae of *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae). 65:717-722.

Martín-Vertedor D, Ferrero-García JJ, Torres-Vila LM. 2010. Global warming affects phenology and voltinism of *Lobesia botrana* in Spain. *Agr For Entomol*. 12:169-176.

Reineke A, Thiéry D. 2016. Grapevine insect pests and their natural enemies in the age of global warming, *Journal of Pest Science* 89: 313-328.

Sitio Web SAG: <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/control-predios-lobesia-botrana>

Tapia, E., Altimira, F., De La Barra, N., Vitta, N., Estay, P. (2018) composición biopesticida en base a hongos entomopatógenos nativos para el biocontrol y/o manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides, ciruelos y arándanos. Método de aplicación de la composición. INAPI (Chile) N°: 201802396.

Capítulo 5

Metodologías de Transferencia Tecnológica para el control invernal de *Lobesia botrana* con hongos entomopatógenos

Paulo Godoy C.

Ing. Agrónomo.

paulo.godoy@inia.cl

1. Antecedentes Generales

Las sugerencias de manejo fitosanitario de la “Polilla Europea de la Vid” o también llamada “Polilla del Racimo de la Vid”, cuyo nombre científico es *Lobesia botrana*, están enmarcadas en las normativas del Programa Nacional de *Lobesia botrana* 2019-2020, bajo la resolución exenta N°6338/2019, emitida por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y en las Autorizaciones Oficiales de Plaguicidas para *Lobesia* de la presente temporada.

Con el fin de controlar la acción de *Lobesia*, en los períodos de aplicación de plaguicidas, será necesario que los interesados conozcan el comportamiento de los ciclos de desarrollo de cada una de las 3 generaciones del insecto. De este modo, tendrán claridad del momento y el tipo de formulación (química o biológica) que deben elegir.

En la última década, en el sector agropecuario se han producido cambios significativos, generando una verdadera revolución tecnológica a la que se ve enfrentada el sector agrícola. Por ello, es necesario, entre otros aspectos, la modernización y adecuación de la entrega de los conocimientos disponibles.

Los beneficios del consumo de frutas para la salud humana son innegables, sin embargo, ha quedado en evidencia que dichos productos están expuestos a agentes químicos, físicos y biológicos que atentan contra su inocuidad, factor que, sumado a las características nutricionales, organolépticas y comerciales, componen la calidad de los alimentos.

Actualmente, estas propiedades son reconocidas y exigidas por los consumidores, quienes desean saber el origen y calidad de los procesos productivos involucrados en la obtención de las frutas que llegan a su mesa.



Lo anterior, implica un gran desafío para los productores frutícolas de la Región Metropolitana (R.M.), porque deben responder simultáneamente a los requisitos sanitarios y a la inocuidad exigida por los mercados internacionales. Por lo tanto, responder en forma eficiente, confiable y ágil a los requerimientos en materia de fitosanidad e inocuidad de los alimentos es un factor de competitividad estratégico para los productores que buscan posicionarse como líderes en el mercado externo.

Sin embargo, la mayoría de los productores se ve enfrentado a problemas entomológicos que no saben enfrentar. Uno de ellos es la *Lobesia botrana* que buscan solucionar recurriendo a plaguicidas, pero sin hacer uso de la información disponible sobre la plaga, el tipo de producto y momento adecuado para su aplicación, niveles de incidencia, períodos de carencia y toxicidad, entre otros factores, generando en la mayoría de los casos, aplicaciones excesivas y un alto nivel de contaminación del ambiente y producto final. A esto se suma un control deficiente de la plaga, debido a un desconocimiento de su ciclo biológico, identificación y control.

En relación a los plaguicidas, Chile ha suscrito una serie de acuerdos bilaterales y multilaterales, vinculantes y no vinculantes, relacionados con el uso sustentable de éstos. Sin embargo, la incorporación a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) ha dejado en evidencia que la carga de plaguicidas por superficie de área cultivable en Chile (Zolezzi, 2014) es de 0,46 ton de plaguicidas/km² sobre 0,21 ton de plaguicidas/km² recomendado por OCDE. Producto de lo anterior, surge como una alternativa sustentable al manejo tradicional de plagas, el Manejo Integrado de Plagas (MIP), el cual se basa en el uso racional de métodos químicos, biológicos y culturales para su control.

El MIP se define como una estrategia económicamente viable, en la que se combinan varios métodos de control para reducir las poblaciones de la plaga a niveles tolerables, minimizando los efectos adversos a la salud de las personas y al ambiente. Su implementación exige como un requisito básico y obligatorio reconocer la plaga de *Lobesia botrana* y sus enemigos naturales, entender su biología y comportamiento, métodos de control disponibles, desarrollar técnicas de monitoreo e incorporar el concepto de umbral de daño económico en las decisiones de manejo.

Hoy existe abundante información tecnológica sobre las interrelaciones que ocurren entre plantas, plagas, enemigos naturales y ambiente, como también

sobre la plaga en cuanto a su cantidad, distribución y el daño que ella produce, acompañado de la proliferación y efecto de los enemigos naturales presentes en los frutales más relevantes en nuestro país.

Como se sabe, Chile no cuenta con un sistema de transferencia agrícola potente que haga posible la masificación rápida del uso de las tecnologías y, a pesar de los esfuerzos que ha hecho el Estado en este sentido, la cantidad de agricultores y extensionistas que acceden a las tecnologías vía métodos tradicionales de transferencia, difusión y capacitación, es muy inferior a las necesidades, a pesar de que la oferta tecnológica ha crecido en los últimos años. En esa línea, es evidente la necesidad de especialistas para asesorías, ya que más de un 50% de los agricultores no tienen acceso a estos profesionales, existiendo un gran interés por los productores de acceder a nuevas tecnologías innovativas en el ámbito productivo, no obstante, no cuentan con las instancias o instrumentos de cómo hacerlo. Por ejemplo: en programas de asistencia técnica del Instituto de Desarrollo Agropecuario (Indap) sólo llegan al 15% de los agricultores familiares. (Berdegué, 2014).

Esta falta de conocimientos tecnológicos impide obtener los potenciales de productividad y eficiencia, dado que se aplican nuevas tecnologías sin disponer de la suficiente información tecnológica que la respalde y, la mayoría de las veces, las recomendaciones las obtienen de personas que no poseen los conocimientos adecuados o poseen otros intereses como son los comerciales.

Entonces, es prioritario empezar a buscar nuevas formas de abordar los aspectos fitosanitarios, ya que el impacto económico, ambiental y sobre todo en la inocuidad de los alimentos, hoy cobran gran importancia en el mercado internacional.

En este escenario la biotecnología, en conjunto con la entomología, son disciplinas que buscan obtener herramientas tecnológicas de información para el control biológico de *Lobesia botrana*, a través de una evaluación *in vitro* de aislados de hongos entomopatógenos (HEP) de *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* contra *Lobesia botrana*.

2. Transferencia y Extensión

Un programa de transferencia y extensión se centra en la necesidad de aumentar los conocimientos sobre las condiciones de los agricultores e incorporar sus puntos de vista en el desarrollo de tecnologías agropecuarias. Al respecto, se debe mencionar que el conocimiento de los agricultores es dinámico, ya que

asimilan datos y conceptos de diversas fuentes como, por ejemplo, proveedores de insumos, medios de comunicación, sus pares y otras fuentes.

En cuanto a la información y tecnología, estas son difundidas a través de redes constituidas por un grupo de personas unidas por vínculos de interés, como resultado de compromisos sociales familiares o tradicionales. Estas redes pueden ser sociales o virtuales, desempeñando un papel fundamental en la adopción de tecnologías nuevas.

Se debe tener presente que la metodología de transferencia y difusión a utilizar debe ser satisfactoria para entregar los conocimientos de los distintos procesos, los cuales deben ser económicamente viables, ambientalmente sustentable y socialmente aceptable, según sea el caso. Para esto se hace imprescindible constituir las instancias más adecuadas de reflexión con los diferentes componentes de la población objetivo de este proyecto (profesionales, técnicos y agricultores) que se quiere intervenir. Se debe colocar especial énfasis en generar las capacidades y habilidades locales que permitan que sea sustentable en el tiempo.

En la medida que miembros de una comunidad se convierten en protagonistas del proceso de construcción del conocimiento, (detección de problemas y necesidades, además de la elaboración de propuestas y soluciones), los resultados obtenidos serán innovaciones tecnológicas más productivas, estables, equitativas y sostenibles, con mayores probabilidades de ser adoptadas y que respondan a preocupaciones sociales relevantes, como la equidad y la sustentabilidad. Bellon (2002).

De acuerdo a la experiencia de los especialistas de INIA y a la investigación que se ha llevado a cabo, la baja tasa de adopción tecnológica observada se evidencia por la existencia de brechas tecnológicas, entre la oferta de la academia y lo aplicado en los predios agrícolas de los agricultores, como consecuencia de: (1) desconocimiento de controladores biológicos para *Lobesia botrana*, (2) tecnologías de control que no están adaptadas o debidamente validadas bajo las circunstancias y/o realidad de la población objetivo involucrada.

Para entregar una solución a lo anterior, en el marco del proyecto "Desarrollo de un biopesticida en base a HEP para biocontrol y/o manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides como una alternativa sustentable en el cambio climático", se desarrollaron varias actividades basadas en la metodología de Grupos de Transferencia de Tecnología (GTT), (García-Huidobro et al., 2006), desarrollada por INIA.

A continuación, se describen algunas de ellas, como: reuniones de socialización, talleres técnicos basados en el sistema de “aprender haciendo”, visitas y reuniones técnicas, unidades de validación y seminarios de difusión.

2.1. Reuniones de Socialización

En estas reuniones se convocó a los agricultores como potenciales integrantes de los GTT. Es así como se invitaron agricultores del Programa de Desarrollo Local (Prodesal) de Isla de Maipo y Lampa, para constituir el GTT de Vides productores urbanos de estas comunas.

El objetivo de estas reuniones fue dar a conocer, en forma detallada los alcances del presente proyecto y los derechos y deberes que implicaba incorporarse a este programa, en el que la confianza y el compromiso son pilares fundamentales para el éxito del mismo. Además, se socializó el proyecto con importantes empresas en el rubro vitivinícola y exportación de uva de mesa (**Figura 1**).



Figura 1. Reuniones de socialización. A) Viña Tarapacá. B) Viña Santa Ema. C) Viña Las Mercedes. D) Exportadora Quintay

2.2. Grupos de Transferencia Tecnológica (GTT)

Se colocó especial énfasis en el acompañamiento/seguimiento de todas las etapas que intervienen en el proceso de aprendizaje involucrado en el MIP, preocupándose más que en las habilidades, en los procesos que las acompañan y/o generan, teniendo siempre como sujeto al agricultor. Esto último adquiere una relevancia especial, en cuanto a que generarán insumos para la identificación y control de *Lobesia botrana*, y responda a los problemas de los agricultores.

Con el objetivo de ir evaluando: i) el grado de aceptación del HEP para el control de *Lobesia botrana*, ii) la dinámica del estadio de pupa de la plaga y iii) un punto de referencia a la labor que desarrollaron los profesionales y técnicos en las unidades de validación, se establecieron 2 grupos de transferencia tecnológica coordinados por extensionistas de INIA.

Los GTT fueron conformados por un grupo cerrado entre 12 y 15 agricultores, quienes deben poseer un alto grado de homogeneidad en cuanto a su ubicación, orientación productiva e intereses, además de estar dispuestos a constituir un grupo estable junto a ello deberán estar dispuestos a compartir sus experiencias y dar facilidades para visitar su predio, todo ello con un alto grado de compromiso, donde la reunión estará basada en la metodología “ayuda al anfitrión”, será el componente central.

2.3. Constitución de Grupos de Transferencia Tecnológica (GTT) en la región Metropolitana

Estos grupos se constituyeron satisfactoriamente con todos sus integrantes, en las fechas indicadas, con un total de 32 agricultores directos, con quienes se realizaron distintas actividades de capacitación e implementación de nuevas tecnologías. Estos grupos se ubicaron en dos comunas de la Región Metropolitana (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Constitución de grupos de transferencia tecnológica.

Día	GTT	Lugar	Integrantes (n°)
11 agosto 2017	<i>Lobesia botrana</i> Lampa	Salón Prodesal Lampa	15
24 enero 2018	<i>Lobesia botrana</i> Isla de Maipo	Casona Isla de Maipo	17

3. Actividades de Capacitación

Las actividades de capacitación realizadas fueron: reuniones técnicas, talleres técnicos, visitas técnicas, unidades de validación y difusión.

3.1. Reuniones Técnicas

Las actividades grupales desarrolladas con los integrantes de los GTT en el campo de uno de los agricultores involucrados, en donde estas fueron constituidas por una visita al predio y una charla técnica. En ambas actividades se contó con la participación activa del especialista, quien entregó información disponible para el agricultor sobre un tema en específico. La charla técnica fue reforzada y complementada con la visita del predio, la cual estuvo basada en la metodología *ayuda al anfitrión* (García-Huidobro et al., 2006)

En función a lo expuesto en el párrafo anterior, los tópicos tratados tienen estrecha relación frente a especificidad de la información generada y focalizar eficientemente la entrega de ésta, según su priorización y dosificación. Estas actividades estuvieron focalizadas en metodologías para el establecimiento de unidades de validación, control invernal de *Lobesia botrana*, identificación de la plaga según estadios (huevo, larva, pupa y adulto) y formulación de bioplaguicidas. Por lo tanto, estas actividades tienen como objetivo la nivelación, de los participantes, en los conocimientos, destrezas y habilidades básicas, relacionados con el uso y manejo adecuado de los bioplaguicidas en base a HEP, asociados a la plaga. Finalmente, teniendo presente que los resultados del aprendizaje se expresan en el logro de objetivos generales y específicos, se puso especial énfasis en definirlos, en forma conjunta entre extensionistas y especialista, señalando el tipo de aprendizaje deseable, adopción en el tiempo involucrado y el lugar más apropiado. Junto a ello se fijó una ruta a seguir cuyas actividades fueron; talleres técnicos, visitas técnicas y asociadas al tema desarrollado en la reunión técnica respectiva (Zolezzi, 2014)

3.2. Talleres Técnicos

Los talleres técnicos (**Figura 2**) son capacitaciones que está a cargo de extensionistas y/o especialistas, según el grado de complejidad del tema a tratar. Ellos acompañan a los productores en terreno para validar e implementar la tecnología propuesta, durante este acompañamiento se busca identificar las brechas y

realizar el ajuste necesario para que los productores puedan incorporar la tecnología propuesta por INIA, en el predio del agricultor y ajustar según su realidad en primera instancia en el productor líder y después al grupo de trabajo constituido.



Figura 2. Talleres Técnicos. A) Metodología para el establecimiento de unidades de validación. B) Resultados control invernal de la plaga *Lobesia botrana*. C) Identificación de la plaga. D) Formulación de bioplaguicidas. E) Identificación, Monitoreo y Control con hongos entomopatógenos de la Plaga *Lobesia botrana*.

4. Metodología de enseñanza interactiva

Para poder cumplir con los objetivos, en relación al grupo de productores al cual estaba enfocada esta capacitación, se utilizó una metodología interactiva para adultos, permitiendo un mayor dinamismo entre agricultores, profesionales e investigadores, distribuidos en grupos de 5 personas a través del concepto aprender haciendo. Para ello, se realizó una capacitación con un tópicos determinado a través de presentaciones en pantalla como se visualiza en la **Figura A)** y, posteriormente, se reforzaron los conceptos a través de un trabajo con pizarras magnéticas, en las que se presentó el ciclo de control de los HEP sobre el estadio de pupa de *Lobesia botrana*, diferenciando entre pupa colonizada por el HEP y pupa sin colonizar, esto consideró la entrega de material bibliográfico para apoyar y complementar de mejor manera la actividad.



Figura 3. A) Presentación en pantalla, B) Capacitación interactiva del ciclo del control con HEP de *Lobesia botrana* a través de pizarra magnética.

5. Evaluación de conocimientos

Para poder evaluar los conocimientos de los agricultores y equipo técnico de los 2 grupos GTT, Isla de Maipo y Lampa, que asistieron al taller teórico-práctico sobre “Identificación, monitoreo y control con HEP de la plaga *Lobesia botrana* en vid”, se realizó una prueba inicial con preguntas que tienen relación con el tema, con el fin de determinar el nivel de conocimientos que tenían los integrantes. Al final de la actividad, se realizó una evaluación final que permitió la comparación entre ambas evaluaciones y así poder determinar el aumento final de conocimientos. Los resultados se presentan en la **Figura 4.**

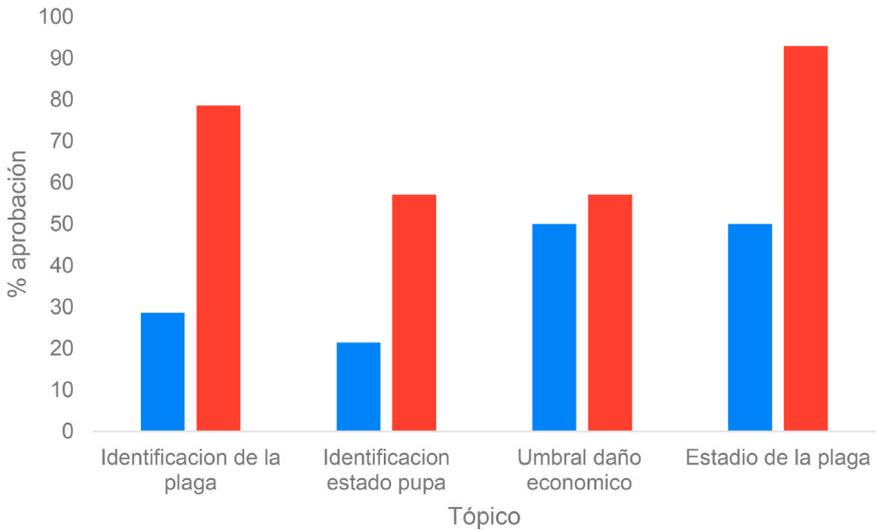


Figura 4. Biología de la plaga. Porcentaje de aprobación en evaluación inicial (barra azul) y final (barra roja).

En la **Figura 4**, se puede observar el aumento de conocimientos en identificación de la plaga en un 50%, identificación del estado de pupa en un 35,7%, umbral de daño económico en un 7,1% y en estadio de la plaga en un 42,9%.

De acuerdo a las brechas preexistentes, se presentaron los conocimientos básicos de identificación y biología de la plaga, que se hacen necesarios al momento de la aplicación de estos bioplaguicidas, ligados a una correcta identificación de la principal plaga que ataca a la vid.

En la **Figura 5**, que se presenta a continuación, se observa la evaluación en el aumento de conocimiento, sobre tópicos de monitoreo, trampas de feromonas, confusores sexuales de la plaga y ubicación de estos confusores.

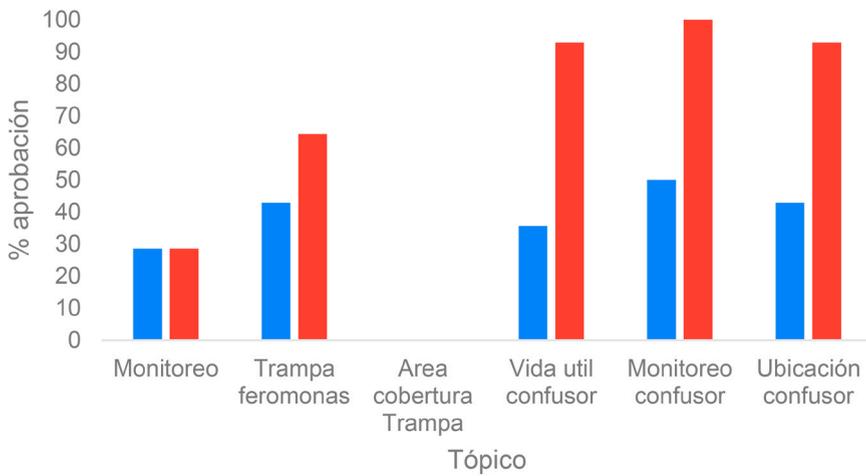


Figura 5. Monitoreo. Porcentaje de aprobación en evaluación inicial (barra azul) y final (barra roja).

Los resultados anteriores muestran que respecto al tópico monitoreo, el grupo mantuvo el conocimiento en la evaluación inicial y final (28,6%). Respecto a las trampas de feromonas existió un aumento de conocimiento de 21,4%. En cuanto al área de cobertura de la trampa existió desconocimiento total de los productores, ya sea en la evaluación inicial y final. En la vida útil del confusor existió un aumento de conocimiento de 57,2%. Mientras que el monitoreo y ubicación del confusor, el aumento de conocimiento fue de 50%.

En la **Figura 6**, se presentan los resultados de evaluación del tópico relacionado con la identificación de los HEP para el control invernal de *Lobesia botrana*, características respecto a la apertura y reutilización de los bioplaguicidas y la importancia del uso de Elementos de Protección Personal (E.P.P) en la aplicación de éstos.

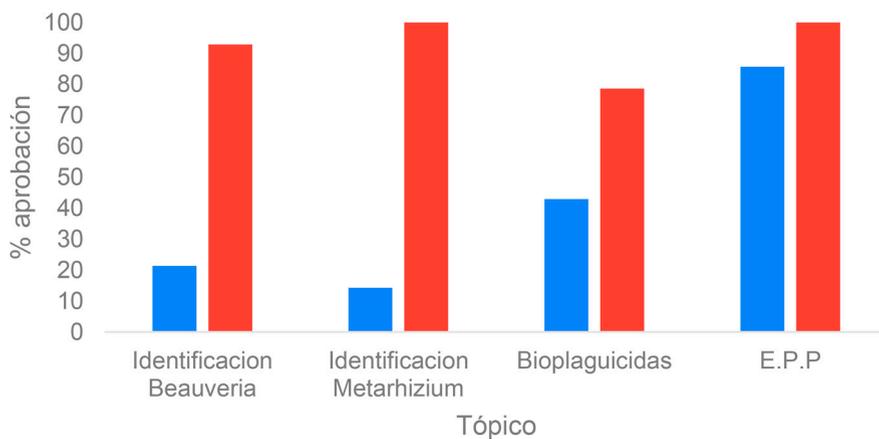


Figura 6. Hongos entomopatógenos. Porcentaje de aprobación en evaluación inicial (barra azul) y final (barra roja).

Los resultados presentados muestran un aumento de conocimientos en la identificación de *Beauveria bassiana* en un 71,5%, en la identificación de *Metarhizium robertsii* el aumento fue de 85,7%, respecto a las características de los bioplaguicidas el aumento de conocimiento fue de 35,7% y sobre la utilización de E.P.P aumentó en 14,3%.

En esta evaluación también se consultó a productores y profesionales involucrados en los 2 grupos de transferencia tecnológica de Isla de Maipo y Lampa, sobre el tipo de formulación preferido, para realizar sus aplicaciones en el control con HEP sobre *Lobesia botrana*. Los resultados se presentan en la **Figura 7**.

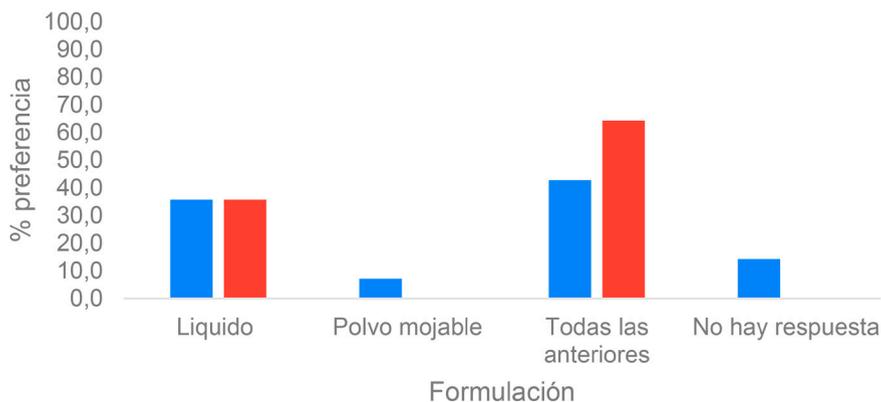


Figura 7. Formulación. Porcentaje de aprobación en evaluación inicial (barra azul) y final (barra roja).

En la evaluación inicial se observa que no existen preferencias muy definidas, la formulación líquida y polvo mojable (opción: todas las anteriores) presenta un 42,9% de las preferencias, la formulación líquida un 35,7%, el polvo mojable un 7,1% y un 14,3% no marcó preferencia.

En la evaluación final, las preferencias están más definidas, ya que fueron elegidas sólo dos de las opciones propuestas, en primer lugar, la opción que incluye la formulación líquida y el polvo mojable con un 64,3% y luego la formulación líquida con un 35,7%.

6. Visitas Técnicas

Las visitas técnicas buscan realizar un acompañamiento al integrante del grupo de transferencia tecnológica, en la implementación de los tópicos propuestos como la biología del insecto, su manejo integrado, identificación del HEP y el control a través de distintas formulaciones, incorporando el concepto de umbral de daño económico en las decisiones de manejo.

Dentro de este contexto es una actividad clave, para determinar la abundancia, distribución y daño de la plaga, como la abundancia y efecto de los HEP presentes en condiciones ambientales del sector.

Este trabajo en conjunto (Transferencista-Agricultor) nos permite reducir la posibilidad de que los bioplaguicidas se utilicen cuando no son necesarios o se emplee el este tipo de producto de forma equivocada, situaciones que se pueden presentar frecuentemente entre los agricultores por desconocimiento.

Es por ello, que se efectúan seguimientos y acompañamientos a los integrantes de los GTT, por parte de los transferencistas y especialistas de INIA mediante estas visitas técnicas, basadas en la metodología "aprender haciendo".



Figura 8. Visita técnica para el aprendizaje de formas de aplicación para el control de *Lobesia botrana* con HEP.

7. Validación Tecnológica

Las nuevas tecnologías, como los bioplaguicidas, generadas en función de los puntos críticos como el control de plagas, definidos conjuntamente entre los agricultores, transferencistas e investigadores, y que además son de difícil adopción, desconocidas o que no están dispuestos a adoptarlas por los riesgos y/o costos que significan, generan la necesidad de dar una respuesta práctica desde el punto de vista tecnológico y puntos críticos. Para esto, se optó por constituir 3 Unidades de Validación en campos de los agricultores integrantes de los GTT.

La metodología que se utilizó está basada en los conceptos y procedimientos de la investigación participativa. En dichas unidades los productores y extensionistas realizaron los trabajos, con sus capacidades, recursos y metodologías, a excepción de aquellos factores considerados tratamientos, los que fueron de responsabilidad de los especialistas INIA.

Con respecto a las actividades programadas en la Carta Gantt del proyecto se decidió trabajar con 3 Unidades de Validación, con el objetivo de evaluar los productos biotecnológicos para el control de pupas en diapausa invernal.

Las unidades de validación de la Región Metropolitana y región Libertador Bernardo O'Higgins se establecieron en época de invierno a partir del 18 de abril hasta el 16 de mayo del año 2019.

-Unidad de validación La Platina (La Pintana) (**Cuadro 2**).

-Unidad de validación Albero Silva (sector A, Placilla) (**Cuadro 3**).

-Unidad de validación Alberto Silva (sector B, Placilla) (**Cuadro 4**).

Las tecnologías validadas fueron: Testigo sin aplicación, producto comercial, *Bauveria* emulsión, *Bauveria* polvo mojable, *Metarhizium* emulsión, *Metarhizium* polvo mojable.

Cuadro 2. Unidad de Validación ubicada en la comuna de La Pintana.

	
Frutal	Vid de mesa, Variedad Red Globe
Objetivo General	Validar las tecnologías de biocontrol con HEP, para el control invernal de pupas <i>Lobesia botrana</i>
Nombre del productor	INIA, La Platina
Ubicación	Av. Santa Rosa 11.610, La Pintana
Geo-referenciación	33°34´ 17.12"S 70°37´ 33.18"O

Cuadro 3. Unidad de validación ubicada en la comuna de Placilla (sector A).

	
Frutal	Vid vinífera Cabernet Sauvignon
Objetivo General	Validar las tecnologías de biocontrol con HEP, para el control invernal de pupas <i>Lobesia botrana</i>
Nombre del productor	Alberto Silva
Ubicación	Camino los Manantiales s/n
Geo-referenciación	34°36´48"S 71°05´23"W

Cuadro 4. Unidad de validación ubicada en la comuna de Placilla (sector B).

	
Frutal	Vid vinífera Cabernet Sauvignon
Objetivo General	Validar las tecnologías de biocontrol con HEP, para el control invernal de pupas <i>Lobesia botrana</i>
Nombre del productor	Alberto Silva
Ubicación	Camino los Manantiales s/n
Geo-referenciación	34°36´48"S 71°05´23"W

8. Difusión del Proyecto

8.1. Seminarios

Una de las metodologías para difundir los resultados del proyecto fueron los seminarios de lanzamiento y otro de avance con entrega de resultados. A éstos se convocaron los actores relevantes del sector, tales como autoridades públicas y privadas, profesionales y agricultores, en los que se abarcaron temas relacionados al proyecto, como, por ejemplo, identificación, monitoreo y control con HEP en estado invernal de *Lobesia botrana*. (Figura 9)



Figura 9. Seminarios. A) Seminario de lanzamiento. B) Seminario de avance. C y D) Expositores seminario.

8.2 Material de difusión

Para entregar la información generada en la investigación y desarrollo del proyecto se utilizaron diversos medios de difusión para llegar a los productores de manera clara y precisa. Entre los materiales utilizados estuvieron: afiches técnicos, guías de campo, fichas técnicas, notas de prensa y videos, entre otros. Este material buscó dar respuesta a los requerimientos y compromisos del proyecto.

En este proyecto se confeccionaron fichas técnicas (**Figura 10**) y un boletín que permita una consulta rápida, oportuna y certera sobre *Lobesia botrana* y sus controladores biológicos.

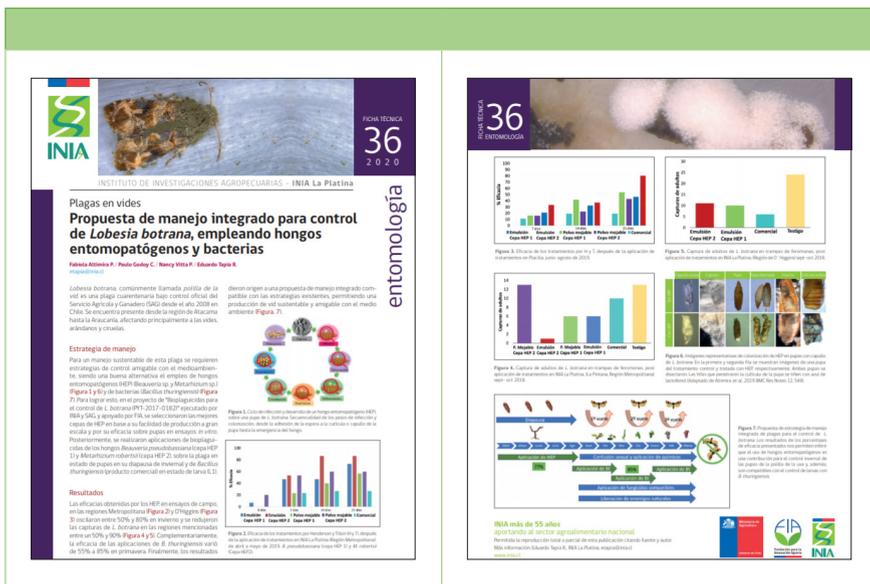
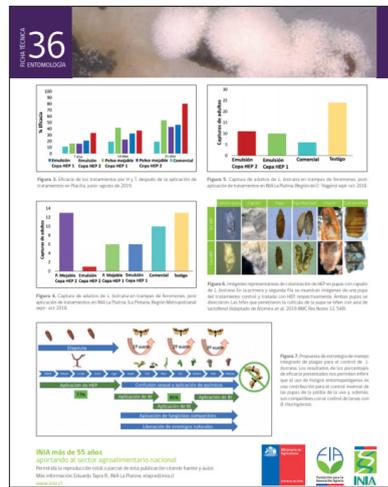


Figura 10. Ficha técnica. Propuesta de manejo integrado para el control de *Lobesia botrana*, empleando HEP y bacterias.



9. Conclusiones

Después de un trabajo extenso de los productores, instituciones públicas, empresas privadas, profesionales, técnicos e investigadores asociados al área que participaron en este proyecto, durante 36 meses se lograron resultados interesantes, como, por ejemplo, la incorporación de tecnologías de Producción Limpia que aseguran la inocuidad alimentaria y el aumento de la eficiencia productiva sustentable con el medio ambiente.

El esfuerzo conjunto entre todos los participantes permitió constituir 2 grupos GTT y capacitar a 32 agricultores, utilizando diferentes metodologías de transferencia y extensión (Reuniones técnicas con 9 temas distintos de capacitación, visitas técnicas, seminarios y material escrito).

Específicamente, se generó un mejoramiento sustantivo de las brechas tecnológicas para el control invernal de *Lobesia botrana* con HEP, gracias a que el grupo de agricultores capacitados en el marco del proyecto aprendió los conocimientos básicos de identificación y biología de la plaga. La utilización de feromonas, ubicación del confusor y su vida útil son algunos aspectos que les permitirán un mejor manejo y un adecuado monitoreo. Asimismo, la identificación de cepas de *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp., principales HEP utilizados para el control en estadio de pupa de *Lobesia botrana*, les permitirá un control de manera más eficiente.

En cuanto a la aplicación de HEP, los productores prefieren cualquiera de las 2 formulaciones presentadas, ya sea la líquida o polvo mojable. Además, reconocen la importancia de una adecuada protección con equipos de protección personal (E.P.P).

10. Bibliografía

https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/lobesia_uvas_30-08-19_vf.pdf

CEPAL/OCDE. 2005. Evaluaciones del desempeño ambiental: Chile. 246 p. Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos, Comisión Económica para América Latina y el Caribe, Santiago, Chile. Disponible en: https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/1288/S0500003_es.pdf (consultado abril 2020)

Berdegúe, J.A. 2014. "La Agricultura Familiar en Chile", Serie Documento de Trabajo N° 152, Grupo de Trabajo Desarrollo con Cohesión Territorial, programa Cohesión Territorial para el Desarrollo. Rimisp Santiago Chile.

Bellon, M.R. 2002. Métodos de Investigación Participativa para evaluar tecnologías: Manual para científicos que trabajan con agricultores. México, D.F., México. CIMMYT, p.106.

Kolmans E. "La Educación popular, los Enfoques Educativos Modernos y la Metodología CaC". http://www.pidaassa.org/mvertical/metodo_herram/La_educacion_popular_y_CaC.pdf.

García-Huidobro V. Raimundo y otros. 2006. "Manual Operativo para Grupos GTT". Santiago, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA N° 146, p.84.

Zolezzi V., Marcelo (ed). 2014. Fortalecimiento de las capacidades de innovación y de asociatividad de los productores hortícolas de la Región Metropolitana. 121p. Boletín N° 288. Instituto de investigaciones agropecuarias. Centro Regional de Investigación La Platina. Santiago.



Boletín INIA / N° 419
www.inia.cl

