



INFORME FINAL

I.
II.

C01-1-A-008

III. ANTECEDENTES GENERALES

NOMBRE DEL PROYECTO: Control biológico de la polilla del tomate (*Tuta absoluta*) mediante integración de organismos entomopatógenos.

CODIGO: C01-1-A-008

REGIÓN(ES) DE EJECUCIÓN: V, Región Metropolitana y VII

FECHA DE APROBACIÓN: Septiembre de 2001

FORMA DE INGRESO (CONCURSO, VENTANILLA): Concurso

AGENTE EJECUTOR:

Nombre : XILEMA S.A.

Dirección : Km. 24 ½, Ruta 60

Ciudad: Quillota : V Región

RUT :

Fax: 33-260831

Teléfono : 2-778 44 60

Email: Xilema@adsl.tie.cl

Cuenta Bancaria:

AGENTES ASOCIADOS: INIA Quilamapu- Chillán

COORDINADOR DEL PROYECTO:

Nombre: Eduardo López Laport

Firma

Cargo en el agente postulante: Gerente General

RUT:

Dirección: Coronel Souper 4015

Ciudad: Santiago

Fono: 2-778 44 60

Región: Metropolitana

Fax : 2-779 21 43

Email: xilema@adsl.tie.cl

COSTO TOTAL DEL PROYECTO:

APORTE DEL FIA:

PERIODO DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO: 1º de Noviembre de 2001 al 30 de Agosto de 2004

IV. RESUMEN EJECUTIVO

Durante el periodo 2001-2004 se desarrolló el Proyecto de control biológico de la polilla del tomate con el objetivo principal de disminuir el uso de pesticidas químicos en el control de esta plaga mediante la selección, formulación y dosificación de un biopesticida a base de hongos entomopatógenos y/o *Bacillus thuringiensis*.

Para ello se realizaron prospecciones de organismos entomopatógenos (Hongos y *B. thuringiensis*) desde zonas productoras de tomate de las regiones V y Metropolitana.

De 129 muestras de suelo colectadas, se obtuvieron 26 aislamientos de hongos entomopatógenos de las especies *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* y 1 aislación de *B. thuringiensis*.

Los aislamientos de hongos encontrados, más los existentes en la colección de INIA-CRI Quilamapu fueron evaluados sobre larvas y huevos de *T. absoluta*, presentando diferentes resultados en cuanto a mortalidad y esporulación sobre el hospedero.

De un total de 139 aislaciones de HEP evaluados en laboratorio, solo dos, Qu-M558 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y Qu-B912 de *Beauveria bassiana*, se seleccionaron como las mas efectivas en el control de huevos y larvas de la polilla. Esta selección se basó tanto en los porcentajes de mortalidad como de esporulación logrados sobre huevos y larvas de la plaga, de manera de asegurar la propagación de la enfermedad en el ambiente sobre el cual se van a aplicar. *B. thuringiensis* fue detectado en una muestra de suelo de un total de 40 muestras y no presentó patogenicidad hacia las larvas de la polilla del tomate. Evaluaciones posteriores de patogenicidad de los aislamientos, sobre enemigos naturales así como sobre insectos polinizadores, demostraron la especificidad con que estos microorganismos actúan, pudiendo complementar el uso de los diversos insectos benéficos en el cultivo de tomate con un biopesticida a base de estas aislaciones, lo que favorecerá la producción limpia.

Aplicaciones del producto sobre plantaciones realizadas en invernaderos del Centro Regional de Investigación, CRI Quilamapu, mostraron resultados positivos en cuanto a control de la plaga, sin embargo, en ensayos de campo en Quillota no fue posible replicar el porcentaje de mortalidad obtenido en laboratorio. Diversos ensayos se realizaron haciendo modificaciones a los procedimientos de preparación de la formulación, volúmenes de mojamiento, frecuencias de aplicación y aumentos de dosis con lo que se logró aumentar los porcentajes de mortalidad.

En condiciones de una alta presión de la plaga no fue posible controlar adecuadamente a la polilla, sin embargo, ante inicios de ataque, su efecto fue similar a lo que proporciona un pesticida convencional.

Los resultados indican que las cepas seleccionadas presentan características promisorias para ser desarrolladas en una próxima etapa de escalamiento comercial, queda pendiente establecer dosis, residualidad, frecuencia y época óptima de aplicación del producto en condiciones comerciales.

V. TEXTO PRINCIPAL

1. Breve resumen de la propuesta original.

La polilla del tomate, *Tuta absoluta* es una plaga primaria del tomate cuyas larvas producen galerías en hojas y frutos reduciendo el valor comercial de estos últimos y favoreciendo pudriciones. Las pérdidas de producción, en ataques severos, superan el 50% y en caso de no realizarse control, ocurre la destrucción de prácticamente la totalidad de los frutos.

El control ha sido enfrentado principalmente con el uso de productos químicos, los cuales no han logrado los resultados deseados debido a la aparición de resistencia en la plaga. Además los pesticidas contribuyen a la eliminación de la fauna benéfica, al aumento de residuos tóxicos en el producto y a la contaminación ambiental.

Una alternativa al uso de productos químicos es el uso de biopesticidas, a base de organismos entomopatógenos, los cuales son capaces de establecerse en forma permanente en un sector debido a su capacidad de renovar inóculo sobre los insectos, no inducen la aparición de resistencia y son efectivos agentes de control de plagas. Además al ser específicos, el uso de estos como controladores de la polilla del tomate sería complementario a la acción de otros enemigos naturales sin provocar o minimizando al máximo el daño a éstos.

El INIA-Quilamapu de Chillán cuenta con una colección de cerca de 800 aislamientos de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* formada a partir de prospecciones realizadas a lo largo de Chile, lo que permite contar con un germoplasma propio, adaptado a las condiciones de nuestro país y que no requiere los complejos procesos de internación que tienen los pesticidas químicos y biológicos provenientes de otros países. Además los hongos entomopatógenos podrían ser complementarios a *Bacillus thuringiensis* cuyo efecto en el control de la polilla del tomate ha sido alentador en ensayos realizados en la V región.

En consecuencia el objetivo general de esta investigación fue disminuir el uso de pesticidas químicos en el control de *Tuta absoluta* mediante la selección, formulación y dosificación de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y/o *B. thuringiensis*. El plan de trabajo contempló la colecta de aislamientos de organismos entomopatógenos desde zonas productoras de tomate y uso de la colección de hongos entomopatógenos existente en INIA Quilamapu, para seleccionar los más patogénicos a esta plaga. Los mejores aislamientos fueron evaluados en insectos benéficos de manera de seleccionar cepas altamente específicas al insecto plaga. Posteriormente se realizaron pruebas de dosis y tiempos letales, de manera de conformar un preparado comercial para ser aplicado en cultivos.

Para la realización del estudio se mantuvo una crianza artificial de polilla del tomate en invernadero y en sala con ambiente controlado. De ella se obtuvieron huevos, larvas y pupas para realizar las pruebas de patogenicidad de diversas cepas de entomopatógenos pertenecientes a la colección INIA-QUILAMAPU y de las cepas recolectadas en muestras de suelo obtenido en las regiones V y Metropolitana durante el desarrollo del proyecto.

En laboratorio se procedió a purificar cultivos de entomopatógenos los que fueron evaluados en su patogenicidad sobre polilla del tomate. De las pruebas realizadas se obtuvo las selecciones más agresivas sobre la plaga. Posteriormente, dichas aislaciones fueron evaluadas en su efecto sobre enemigos naturales asociados al manejo de plagas del tomate así como sobre insectos polinizadores.

Las formulaciones de entomopatógenos seleccionadas fueron sometidas a distintos tratamientos para evaluar su resistencia a deshidratación y a la acción de la luz UV.

Obtenida la formulación del biopesticida se procedió a evaluaciones de campo en invernaderos comerciales en la V región.

De las muestras de suelo fue posible recuperar cepas de entomopatógenos, sin embargo, las mas agresivas y promisorias para el control de la polilla del tomate resultaron ser las cepas Qu-M 558 y Qu-B 912 correspondientes a *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y *Beauveria bassiana* respectivamente, pertenecientes a la colección INIA-QUILAMAPU. Con ellas se obtuvo mortalidades del 60-77% sobre huevos en pruebas de laboratorio y de hasta un 86% sobre larvas. Se logró además proporcionarle a la formulación una adecuada resistencia a la deshidratación y a la radiación UV.

Se evaluó el efecto de las cepas seleccionadas sobre insectos benéficos y polinizantes no observándose efecto de mortalidad en *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, *Trichogramma nerudai* ni *Encarsia formosa* por lo que su uso es perfectamente compatible en programas de manejo integrado de plagas.

Se logró almacenar por 6 meses ambas cepas manteniendo su germinación en un 76%, de igual modo, se logró proteger a las conidias del efecto negativo de la luz UV mezclándolas con aceite Sunspray. Por otra parte, se logró mantener la actividad de conidias en el suelo durante 15 días después de una aplicación lo que se traduce en un efecto de mortalidad sobre pupas de la polilla. Su persistencia es mayor a lo logrado en la aplicación al follaje que fue de 10 días.

Sin embargo, en ensayos de campo no fue posible replicar el porcentaje de mortalidad obtenido en laboratorio. Diversos ensayos se realizaron haciendo modificaciones a los procedimientos de preparación de la formulación, volúmenes de mojamiento, frecuencias de aplicación y aumentos de dosis con lo que se logró aumentar los porcentajes de mortalidad. En condiciones de una alta presión de la plaga no fue posible controlar adecuadamente a la polilla, sin embargo, ante inicios de ataque, su efecto fue similar a lo que proporciona un pesticida convencional.

Los resultados indican que las cepas seleccionadas presentan características promisorias para ser desarrolladas en una próxima etapa de escalamiento comercial.

2. Cumplimiento de los objetivos del proyecto:

OBJETIVOS ESPECIFICOS	RESULTADOS OBTENIDOS
Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos y <i>B. thuringiensis</i> específicos para el control de <i>Tuta absoluta</i> .	Se seleccionó 2 aislamientos de Hongos Entomopatógenos específicos para el control de <i>T. absoluta</i>
Formulación de un biopesticida de largo efecto residual y capaz de proteger al organismo entomopatógeno contra la desecación y radiación UV.	1 Formulado a base de esporas puras para ser mezclado con aceite mineral miscible Sun spray.
Evaluación de la efectividad de <i>B. thuringiensis</i> . y hongos entomopatógenos en condiciones de terreno y su complementariedad con los insectos benéficos <i>Trichogramma sp.</i> , <i>Encarsia formosa</i> , <i>Bombus terrestris</i> y <i>Apis mellifera</i> .	Evaluaciones del producto en plantaciones experimentales determinaron buenos resultados de control de la plaga, sin embargo en cultivos comerciales el control fue menor cuando hubo alta presión de la plaga. No hubo efecto detrimental sobre la entomofauna benéfica
Transferir el conocimiento adquirido a los agricultores, asesores de cultivos de tomate, ingenieros agrónomos y estudiantes de Agronomía.	Asistencia y presentación de los resultados obtenidos en Congresos de Entomología, realización de charlas técnicas a estudiantes de escuelas técnicas y universitarios y realización de un seminario dirigido a profesionales del CRI-Quilamapu. Elaboración de dos tesis de grado en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

3. Aspectos metodológicos del proyecto:

METODOLOGIA

ACTIVIDAD 1. Crianza de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae)

Se construyó un invernadero para la crianza de Polilla del Tomate en dependencias de Xilema S.A. en Quillota, las medidas fueron de 8,30 x 20 metros, de estructura metálica en forma semicircular cubierto con polietileno, malla antiáfido y cubierta de polietileno a modo de cortinas, con antecámara con puerta de corredera entre la antecámara y el cultivo y dos puertas batientes al ingreso de la antecámara (Anexo Fotos 1 y 2).

El invernadero fue instalado con fecha 20 de noviembre de 2001. Luego de ello se procedió a la compra de 340 macetas con capacidad de 7 lt cada una, las cuales fueron llenadas con una mezcla de suelo que tenía 50% de tierra de hoja, 25% de suelo y 25% de arena, (Anexo Foto 3), previo al llenado de las macetas la mezcla de suelo fue tratada con vapor de agua para su desinfección. Luego de ello se colocaron los plantines de tomate. Las macetas se dispusieron en 6 hileras distanciadas a 1,20 metros entre ellas; (Anexo Foto 4). Las plantas fueron guiadas en dos ejes mediante cinta a una altura de 1,95 metros (Anexo Foto 4). Por otra parte, cuando iban apareciendo los racimos florales éstos se eliminaban para favorecer al crecimiento vegetativo.

Se realizaron los manejos de fertilización, riego y manejos fitosanitarios para prevenir la pérdida de las plantas.

Una vez que las plantas tuvieron un desarrollo suficiente para soportar una buena presión de la polilla, se iniciaron los preparativos para proceder a la inoculación con adultos de polilla dentro del invernadero.

Para la inoculación con adultos de polilla fue necesario construir una trampa de luz consistente en una fuente lumínica (tubo fluorescente circular), sobre un embudo conectado a un tubo cuya abertura inferior se conectaba a una batería de crianza de insectos, (Anexo Fotos 6, 7 y 8). Esta fue instalada en dependencias de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, en el sector de La Palma, las que permitieron capturar un alto número de individuos por noche.

Las polillas colectadas en la batería fueron liberadas dentro del invernadero, (Anexo Fotos 9 y 10). Esta inoculación sólo fue necesario realizarla al inicio del proyecto y posteriormente la crianza se mantuvo por si sola.

Debido al temporal del 6 de junio del año 2002 que destruyó el cultivo de tomate en Xilema, se habilitó un invernadero de policarbonato en las dependencias de la Facultad de Agronomía de la PUCV con el propósito de mantener un pie de cría de polillas para el momento en que hubiese que cambiar el cultivo de tomate mantenido en Xilema y mientras se iniciara un segundo ciclo de producción en Xilema. El invernadero tiene una dimensión de 5 metros de ancho por 6 metros de largo y 3 metros de alto, con una antecámara de ingreso con una puerta corredera y otra puerta interior con dos entradas correderas (derecha e izquierda) ingresando a dos compartimentos, ambos de 4 metros de largo por 2,5 metros de ancho. En él se dispusieron 48 plantas por compartimento o 96 plantas dentro del invernadero al término del periodo. Para preparar las nuevas macetas se utilizó tierra fumigada.

En dependencias de INIA-Quilamapu, Chillán se estableció un cultivo de tomates en invernadero hacia fines del año 2002. Para ello se utilizaron seis salas con malla antiafido de 6,4 mt de largo y 3,2 mt. de ancho cada una.

En ellas se colocaran 90 plantas de tomate variedad "Fortaleza" distribuidas en cuatro hileras separadas entre si por 0,5 mt de distancia.

Una vez que las plantas tuvieron un desarrollo suficiente para soportar una buena presión de la polilla, se inició la inoculación con adultos de polilla provenientes de pupas enviadas desde Xilema, Quillota.

Semanalmente se fueron liberando 10 a 20 adultos por sala, hasta alcanzar una presión de 80 adultos por cultivo.

Simultáneamente, tanto en Quillota en el invernadero de Xilema como en el invernadero de Policarbonato de la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso se estableció un nuevo cultivo de tomate en enero de 2003 los que fueron infestados con polilla en marzo.

Los cultivos de tomate fueron renovados periódicamente tanto en INIA Quilamapu como en la zona de Quillota en el invernadero de Xilema como en el de Policarbonato ubicado en la PUCV, lo que permitió abastecer permanentemente de polilla del tomate para la realización de las pruebas contempladas en el proyecto.

ACTIVIDAD 2. Colecta de terreno de *Bacillus thuringiensis* y hongos entomopatógenos

Durante el período de noviembre del 2001 hasta junio de 2003 se desarrolló la colecta en terreno de muestras de suelo y larvas de polilla del tomate en tejido vegetal en las regiones V y Metropolitana.

El objetivo fue prospectar la presencia de hongos entomopatógenos y/o *Bacillus thuringiensis* presentes en las muestras colectadas a partir de cultivos comerciales establecidos de tomate, tanto al aire libre como bajo invernadero y de suelos no intervenidos por la actividad humana.

Para el caso de la colecta de suelo ésta consistió en tomar muestras de suelo tanto dentro del cultivo como fuera de él, de suelo cercano no cultivado y en lo posible con presencia de matorral. Cada muestra de suelo fue tomada con una pala de jardín a una profundidad cercana a los 15 cm colectando de dos o tres puntos diferentes la cantidad aproximada de 400 gr de suelo el cual era incorporado a una bolsa transparente la que inmediatamente fue identificada.

La identificación de cada muestra llevaba el nombre del productor, la fecha de colecta, zona, región y lugar de colecta, en este último caso cuando la muestra era tomada del interior del cultivo se le denominaba "Cultivo" y cuando era tomada de fuera de él se le denominaba "Aledaño".

Para ello se seleccionaron predios de la V Región, Provincia de Quillota distribuidos en los sectores de San Pedro y Pocomayo. Por otra parte, en la Región Metropolitana se seleccionaron predios distribuidos en las localidades de Mallarauco y Pomaire. También se colectaron muestras de la zona de San Javier (VII Región) y Freire (IX Región).

El requisito bajo el cual se seleccionaron los predios fue que desarrollaran cultivo de tomate sobre suelos no fumigados, esta característica se dio en cultivadores de tomate tanto al aire libre como bajo invernadero. Los antecedentes de cada predio fueron diversos variando desde aquellos que cultivaban tomate por primera vez sobre ese suelo hasta agricultores con varios años de cultivo de tomate en el mismo suelo. Respecto a suelo no intervenido las muestras fueron tomadas de la V región, sectores de Rautén y Parque Nacional La Campana (sectores de Olmué y Ocoa).

Todas las muestras de suelo colectadas entre las regiones V y Metropolitana fueron enviadas a INIA Quilamapu para la obtención de hongos entomopatógenos.

ACTIVIDAD 3. Aislamiento y criopreservación de hongos entomopatógenos y *Bacillus thuringiensis*.

Aislamiento y criopreservación de hongos entomopatógenos

Una vez obtenidas las muestras de suelo, la captura de hongos entomopatógenos se realiza mediante el sistema de cebado de suelo con larvas de la polilla de la cera (*Galleria mellonella*) cuyo procedimiento se describe a continuación:

- Los materiales utilizados son:

1. Larvas de *Galleria mellonella*.
2. Recipientes plásticos de 250 mL de capacidad.
3. Muestras de suelo.
4. Placas de Petri estéril
5. Papel filtro
6. Agua destilada y estéril.

- El procedimiento fue el siguiente (Woodring & Kaya, 1988):

1. Poner una capa de 1 a 2 cm de la muestra de suelo en el fondo del recipiente.
2. Colocar 4 a 5 larvas sobre la capa de suelo.
3. Completar el volumen del recipiente con el resto de la muestra de suelo, sin compactar.
4. Incubar a temperatura de 20 a 24 °C y oscuridad por 5 días.
5. Colectar las larvas, lavarlas con agua destilada e incubar en las placa de Petri con papel absorbente humedecido para favorecer el desarrollo de posibles entomopatógenos

Cada uno de los aislamientos fue cultivado según se describe:

Las estructuras fungosas desarrolladas sobre las larvas parasitadas fueron cultivadas en placas Petri con el medio agar papa dextrosa (APD) y repicadas hasta obtener un cultivo puro. Estos cultivos fueron traspasados a tubos de ensayo con APD para ser guardados en frío (5°C).

CRIOPRESERVACIÓN DE ESPORAS

ACONDICIONAMIENTO

1. Sembrar las esporas en agar e incubar hasta que la colonia se encuentre cubierta de esporas y libre de contaminación.
2. Preparar glicerol al 10%, y esterilizar por 15 minutos a 120°C y 1 atm.
3. En cámara de flujo laminar, depositar 5 a 10 ml de glicerol al 10% (estéril) sobre la superficie de la colonia y remover las esporas con una espátula.
4. Depositar 1 ml de la suspensión de esporas en un criotubo estéril.
5. Incubar los criotubos a 5°C por una hora.
6. Incubar los criotubos a -20°C por una hora.
7. Depositar los criotubos en nitrógeno líquido.

DESCONGELADO

1. Extraer los criotubos del nitrógeno líquido y rápidamente depositar en un recipiente con agua a 27°C.
2. Dejar en el agua hasta que la suspensión de esporas vuelva a su estado líquido (aproximadamente 30 minutos después) y luego retirarlos del agua.
3. En cámara de flujo laminar, depositar 0,2 ml de suspensión de esporas en agar papa dextrosa y distribuirlos sobre la superficie.
4. Para evaluar la supervivencia del hongo, extraer un trozo del agar inoculado, depositarlo sobre un portaobjeto y contabilizar al microscopio las esporas germinadas y no germinadas para obtener el porcentaje de germinación.

Aislamiento y criopreservación de *Bacillus thuringiensis*

La captura de *Bacillus thuringiensis* se realizó mediante la suspensión de suelo en agua destilada estéril, cuyo procedimiento se describe a continuación:

- Los materiales utilizados son:

1. Tubos precipitados con 9 mL de agua destilada estéril.
2. Placas de petri con medio cultivo agar nutriente pH 7.
3. 1 gr. muestras de suelo.
4. Agitador mecánico
5. Unidad Baño María
6. Agua destilada esteril
7. Asa metálica.
8. Porta objetos
9. KOH al 10%
10. Cristal violeta.

- El procedimiento fue el siguiente (Klein, 1994):

1. Colocar 1 gr. de suelo en el tubo con agua destilada estéril.
2. Agitar por 20 minutos
3. Calentar a baño María y mantener a 80°C por 10 minutos.
4. Dejar enfriar
5. Tomar 1 mL de cada muestra y hacer diluciones en agua destilada estéril de 1/10, 1/100, y 1/1000.
6. Tomar una alicuota de cada disolución con asa metálica y rayar en placas de petri con medio agar nutriente.
7. Incubar a temperatura de 30 °C por 24 hrs.
8. Observar la formación de colonias
9. Colectar una muestra de cada colonia y macerar sobre porta objeto con una gota de KOH.

Sembrar las colonias resistentes al KOH, sobre agar nutriente e incubar por 48 hr hasta la posible formación de esporas.

10. Tomar una muestra de cada colonia y teñir con cristal violeta.
11. Observar la muestra con aceite de inmersión en microscopio de 100X.
12. Aislar las colonias que presenten cristales y criopreservar.

Las colonias identificadas como *Bacillus thuringiensis* fueron cultivadas en placas con medio agar nutriente y repicadas hasta obtener un cultivo puro. Estos cultivos fueron traspasados a tubos ependorf con agar nutriente y cubiertos con glicerol al 10% para ser guardados en congelador (-20°C).

ACTIVIDAD 4. Evaluación de organismos entomopatógenos encontrados y de la colección INIA de hongos entomopatógenos.

Para estos ensayos se utilizaron larvas y huevos de *Tuta absoluta* provenientes de la crianza mantenida en Quillota (V Región) y en Chillán (VIII Región).

El inóculo fresco de cada aislación fue producido en placas de Petri con APD, las que fueron incubadas a 25°C por 20 días aproximadamente, hasta que el hongo hubo esporulado. Las conidias fueron cosechadas desde la superficie del cultivo, realizando una suspensión en agua destilada estéril más un 1% de humectante (Twen 80) la que luego fue llevada a un agitador mecánico para disgregar las conidias. La concentración de conidias fue determinada utilizando una cámara de recuento Neubauer. Se utilizaron suspensiones de 1.13×10^7 conidias mL⁻¹ equivalente a una dosis de 10^{13} conidias ha⁻¹. Estas fueron aplicadas mediante un sistema de torre de pulverización (Potter tower) (Figura 1).



Figura 1: Sistema de pulverización “Potter tower”

Las primeras aplicaciones de HEP fueron efectuadas sobre larvas de la polilla. Se aplicaron soluciones de hongo sobre 10 larvas mantenidas en placas de Petri con hojas desinfectadas de tomate. Diariamente se evaluó la mortalidad y se observó síntomas de parasitismo.

Dado que las larvas se encuentran protegidas por el mesófilo de las hojas donde hacen galerías, se realizaron aplicaciones sobre huevos del insecto. Para ello se aplicó soluciones de espora de cada aislamiento sobre 10 huevos de *T. absoluta*, los que fueron mantenidos en placas de petri con hojas de tomate frescas y desinfectadas. Diariamente se registró la emergencia de larvas y al cabo de 10 días de inoculados se procedió a incubar los huevos sin emergencia en cámara húmeda para observar síntomas de parasitismo.

Para comparar la patogenicidad entre aislamientos se calcularon los porcentajes mortalidad de larvas y de emergencia de larvas a través del tiempo y la esporulación sobre las larvas y sobre los huevos.

ACTIVIDAD 5. Pruebas con insectos benéficos

A pesar de la alta especificidad que poseen los entomopatógenos, se comprobó que los aislamientos seleccionados para el control de *T. absoluta*, Qu-M558 y Qu-B912 eran inofensivos para los enemigos naturales (parásitos de huevos de la polilla, del género *Trichogramma* y el parásito *Encarsia formosa*, de la mosquita blanca de los invernaderos) y para abejas (*Apis mellifera*) y abejorros (*Bombus terrestris*).

1. Evaluación de los aislamientos sobre *Trichogramma nerudai*

1.a Emergencia y posterior parasitismo de *T. nerudai* emergidos desde huevos de *Sitotroga* inoculados con HEP.

Los aislamientos, fueron aplicados mediante el sistema de pulverización (Potter tower) a una concentración 10 veces superior a la normalmente utilizada en terreno (10^{13} conidias/ha), sobre huevos de *Sitotroga cerealella* recién parasitados con *Trichogramma nerudai* y con más de una semana de parasitación. Se evaluó el efecto de los hongos sobre el grado de desarrollo del parasitoide, el porcentaje de emergencia de *Trichogramma* y la capacidad de parasitar nuevos huevos.

Para este ensayo se utilizó un diseño experimental completo al azar, con 5 tratamientos, cuatro repeticiones de 100 huevos de *Sitotroga cerealella* recién parasitados y con mas de una semana de parasitación como unidades experimentales. Para cada aislamiento se calculó el porcentaje de emergencia de *Trichogramma* y porcentaje de parasitismo sobre huevos de *Sitotroga cerealella*, los que fueron sometidos a análisis de varianza y separación de media mediante la prueba protegida de Fisher.

1.b Susceptibilidad de adultos de *Trichogramma* a los hongos.

Se realizó un nuevo ensayo en el cual las aislaciones se inocularon mediante el sistema de torre de pulverización a una concentración 10^7 conidias/mL sobre tubos de ensayo de 2 cm de diámetro y 14 cm de largo, que luego fueron llevados a cámara de flujo laminar para retirar el exceso de humedad por medio de aire seco.

Aproximadamente 100 adultos de *T. nerudai* fueron infectados introduciéndolos en los tubos por medio de un sistema de atracción luminosa y mantenidos por 24 horas. Posteriormente a cada uno de los tubos se introdujo 100 huevos de *Sitotroga cerealella* sin parasitar, evaluándose el efecto de los hongos en la capacidad de *Trichogramma* de parasitar huevos.

Para esta evaluación se utilizó un diseño experimental completo al azar con tres tratamientos y cinco repeticiones de 100 huevos de *Sitotroga cerealella* como unidad experimental. Para cada aislamiento se calculó el porcentaje de parasitismo sobre huevos, los que fueron sometidos a análisis de varianza y separación de medias mediante la prueba de Duncan.

2. Evaluación de los aislamientos sobre *Encarsia formosa*.

2.a Parasitismo de *E. formosa* sobre ninfas de *T. vaporariorum* inoculadas con Qu-M558 y Qu-B912.

Suspensiones de 10^7 conidias/mL de cada aislamiento, fueron aplicadas sobre ninfas de mosquita blanca (*T. vaporariorum*), mediante el sistema de pulverización. Como control se utilizó ninfas tratadas con una solución de agua destilada con Tween 80.

El parasitismo sobre ninfas de *T. vaporariorum* por adultos de *Encarsia formosa* y la micosis sobre las ninfas parasitadas inoculadas fueron evaluadas diariamente desde el primer día de tratadas.

El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar, con 3 tratamientos y 5 repeticiones, la unidad experimental consistió en 10 ninfas sanas.

El parasitismo de *E. formosa* sobre las ninfas inoculadas fue expresado como porcentaje de ninfas parasitadas con los diferentes tratamientos. Estos resultados fueron sometidos a análisis de varianza y separación de medias mediante la prueba de Duncan.

2.b Capacidad parasítica de adultos de *E. formosa* inoculados con Qu-M558 y Qu-B912.

Para este ensayo se utilizaron tubos de ensayo de 2 cm de diámetro y 14 cm de largo, los que fueron inoculados con soluciones de los aislamientos en concentración de 10^7 conidias/mL.

Luego de aplicar los hongos se introdujeron en los tubos 100 adultos de *E. formosa* para mantenerlos en el interior por 24 horas. Posteriormente en cada uno de los tubos se introdujo 100 ninfas de *T. vaporarium* sin parasitar, evaluándose el efecto de los hongos en la capacidad de *Encarsia* para parasitar.

Para esta evaluación se utilizó un diseño experimental completo al azar con tres tratamientos y cinco repeticiones de 100 ninfas de *T. vaporariorum* como unidad experimental. Para cada aislamiento se calculó el porcentaje de parasitismo sobre ninfas, los que fueron sometidos a análisis de varianza y separación de medias mediante la prueba de Duncan.

2.c Emergencia de *E. formosa* desde ninfas parasitadas de *T. vaporariorum* inoculadas con Qu-M558 y Qu-B912.

Soluciones de concentración de 10^7 conidias/mL fueron aplicadas sobre ninfas parasitadas por *E. formosa*. Una vez inoculadas las ninfas parasitadas se incubaron en placas a 20°C, para observar el posible desarrollo de micosis y esporulación de los hongos. El diseño experimental consistió en 3 tratamientos, con cinco repeticiones y 100 ninfas parasitadas de *T. vaporariorum* como unidad experimental. Como tratamiento control se utilizó 100 ninfas parasitadas por *E. formosa* sobre las cuales se asperjó agua con Twen 80 al 1%. Los resultados obtenidos fueron transformados a porcentaje de emergencia, los que fueron sometidos a análisis de varianza y separación de media por la prueba de Duncan.

3. Evaluación de los aislamientos sobre *Apis mellifera*.

3.a Parasitismo de *A. mellifera* a través de inoculaciones de HEP en flores.

Se utilizaron núcleos de abejas *A. mellifera*, los que incluían una reina fecundada, obreras adultas y 4 panales con cría en diferentes estadios. Las colmenas fueron confinadas en invernadero con malla antiáfido y con plantas de tomate en floración. Mediante aspersiones con pulverizador manual se aplicó sobre las flores de tomate los aislamientos Qu-M558 y Qu-B912 en concentración de 10^{13} conidias/ ha.

Para evaluar la mortalidad de abejas diariamente se observó la presencia de obreras muertas en la piquera. Los insectos muertos fueron incubados en placas con humedad a temperatura de 20°C para observar el posible desarrollo de hongos.

3.b Parasitismo sobre *A. mellifera* con inoculaciones de HEP en la colmena.

Se realizaron ensayos de campo, para lo cual se trasladaron las colmenas al aire libre de manera que realizaran pecoreo y colecta de néctar en forma natural. Previo a las inoculaciones las colmenas fueron constantemente revisadas para la detección y control de enfermedades. Después de 2 semanas de mantención, se aplicó sobre los panales los aislamientos en concentración de 10^7 con/mL. El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar, con 3 tratamientos y 2 repeticiones, la unidad experimental consistió en una colmena de abejas con 6 panales vacíos. Los resultados obtenidos fueron comparados utilizando test de Chi cuadrado múltiple sobre tablas de contingencia de 2 x 2 (Gómez y Gómez, 1984), en base a la hipótesis esperada de proporción de panales trabajados v/s panales sin trabajar para cada tratamiento.

4. Evaluación de los aislamientos sobre *Bombus terrestris*.

4.a Parasitismo de *B. terrestris* a través de inoculaciones de HEP en flores.

Para este ensayo se utilizó una colmena de *B. terrestris* la que fue confinada en invernadero con malla antiáfido y con plantas de tomate en floración. Mediante aspersiones con pulverizador manual se aplicó sobre las flores de tomate los aislamientos Qu-M558 y Qu-B912 en concentración de 10^{13} conidias/ ha. Para evaluar la mortalidad, se observó diariamente la presencia de abejorros muertos en la piquera y sus alrededores. Los insectos muertos fueron incubados en placas con humedad a temperatura de 20°C para observar el posible desarrollo de hongos.

ACTIVIDAD 6. Pruebas de dosis y tiempo letal.

De los aislamientos seleccionados y aislados en la primera etapa, 2 fueron utilizados para las pruebas de dosis (Qu-B912 y Qu-M558).

Los hongos a utilizar fueron sembrados en placas con agar papa dextrosa (APD), y luego de 15 días de incubación, las conidias de la superficie de la colonia fueron cosechadas para preparar las distintas suspensiones en agua más 1% Tween 80. Las suspensiones fueron preparadas en diferentes concentraciones de inóculo: 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 esporas/ml, que equivalen a 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} y 10^{14} esporas/ha, al ser pulverizadas con la Potter Tower. Las suspensiones fueron aplicadas sobre 10 larvas y 10 huevos de *T. absoluta* mantenidos en placas plásticas con hojas sanas de tomate, y evaluadas periódicamente en cuanto a mortalidad y desarrollo de micosis. También se evaluó la capacidad de infección por ingestión de los hongos, por lo que se aplicó soluciones de cada aislamiento sobre hojas de tomate que posteriormente fueron colocadas como alimento a 10 larvas sanas de *T. absoluta*.

El diseño experimental de cada ensayo fue completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento. Con la respuesta de mortalidad de cada aislamiento a distintas dosis se realizaron análisis del área bajo la curva. Se calculó las dosis letales para matar el 90% (CL90) y 50% (CL50) de la población de larvas y huevos, de manera de estimar las posibles dosis para aplicaciones de campo.

ACTIVIDAD 7. Elaboración de una formulación de biopesticida resistente a la desecación.

Para estos ensayos las esporas fueron producidas en forma masiva en medio sólido a base de arroz parboiled esterilizado, el que fue incubado a 25°C por dos semanas y luego secado para facilitar la extracción de las conidias. Con conidias de las cepas seleccionadas se realizó una prueba de resistencia a la deshidratación, con 5 niveles de humedad: 5, 10, 15, 20 y 25%, logrados en una campana de vacío con distintos tiempos de exposición a silica gel. Para evaluar germinación, se realizaron suspensiones de las conidias en agua + Tween 80 (1%), las que luego fueron sembradas en placas de Petri con agar papa dextrosa. Después de 24 horas de realizada la siembra en placas, se observó al microscopio la proporción de conidias germinadas versus las no germinadas, contabilizándose en total 200 conidias por repetición. El diseño utilizado fue uno completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento.



Figura 2: Conidias de *Metarhizium* y *Beauveria* sp. almacenadas al vacío.

ACTIVIDAD 8. Elaboración de una formulación de biopesticida resistente a la luz ultravioleta.

0.1 gr de esporas de cada aislamiento fueron suspendidos en agua destilada con humectante (Tween 80 al 0.1%), aceite mineral puro (SIGMA®), aceite mineral miscible (Sun Spray ®) y protector solar (Blankophor ®).

Una alícuota de cada solución fue esparcida con un asa sobre placas de petri con medio agar agua.

La exposición de las esporas a radiación UV se realizó colocando cada placa sin tapa bajo dos lámparas de luz UV (visible) de 25W. La intensidad de luz a la que fueron expuestas las placas fue de 21 mW/cm² de acuerdo a la distancia placa-lámpara (5,5 cm desde la lámpara). Adicionalmente se evaluó la resistencia de las aislaciones formuladas colocando sobre las placas plástico protector anti UV. Los tiempos de exposición para cada tratamiento fueron: 0, 1, 5, 10 y 15 segundos.

Luego de la exposición a radiación UV las placas fueron selladas e incubadas en oscuridad a 25°C para después de 24 horas, evaluar el número de esporas germinadas. Se evaluaron tres repeticiones por exposición y un total de 200 conidias por repetición.

Los porcentajes de germinación después del periodo de incubación fueron calculados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Germinación (\%)} = (\text{Cg/Ct}) \times 100$$

Donde Cg es el número de conidias germinadas en cada repetición por un periodo t de tiempo y Ct es el número total de conidias evaluadas.

Los datos fueron analizados mediante análisis de las curvas de supervivencia de conidias para cada formulación con y sin plástico anti UV, para seleccionar el protector más efectivo.

ACTIVIDAD 9. Evaluaciones en el cultivo.

- Descripción del ensayo realizado en la VIII región, INIA – Quilamapu, Chillán.

Esta prueba se realizó en una de las salas previamente inoculadas con adultos de *T. absoluta* del invernadero de vidrio perteneciente al CRI Quilamapu. 80 plantas de tomate de la variedad Fortaleza se transplantaron a maceteros plásticos de 650 cc de capacidad, donde fueron fertilizadas con tres parcialidades de 10 gr/pl de nitrato de potasio y regadas diariamente. Estas plantas se separaron por tratamiento en grupos de 20 estableciéndose una distancia de 1 m como medio de aislamiento entre ellos.

Una vez que estas plantas alcanzaron el desarrollo suficiente para soportar una alta presión de plaga, se realizaron aplicaciones semanales de los aislamientos Qu-B912, Qu-M558 y la mezcla de ambos. Se utilizaron 0.14 gr de Qu-M558, 0.35 gr de Qu-B912 y la mezcla de 0.17 gr de Qu-B912 con 0.07 gr de Qu-M558, equivalente a una dosis de 10^{13} conidias/ha que fueron suspendidas en 0.3 ml de aceite mineral (Sun spray) y 700 ml de agua de pozo estéril (35 ml por planta). Para facilitar la disgregación de las conidias se agregó 0.3 ml de humectante (Twin 80). Posteriormente se llevó al agitador mecánico por 30 minutos para aplicar sobre las plantas utilizando un pulverizador manual. La frecuencia de aplicación fue de siete días, durante un período de siete semanas.

Para esta evaluación se utilizó un diseño experimental completo al azar con cuatro tratamientos y veinte repeticiones de una planta de tomate como unidad experimental. Para cada aislamiento se calculó el porcentaje de folíolos dañados, los que fueron sometidos a análisis de varianza y separación de medias mediante la prueba de Duncan.

Una segunda evaluación en condiciones de campo se realizó en un invernadero de malla antiáfido, dividido en 6 salas de 6,4 x 3,2 m cada una. En cada sala se plantaron 50 plantas de tomate var. Fortaleza. La distancia de plantación fue de 0,3 m sobre la hilera en surcos distanciados a 0,5 m. La fertilización se realizó aplicando nitrógeno como nitrato de potasio y fósforo como superfosfato triple en tres parcialidades de 10 gr/planta. El cultivo fue regado adecuadamente.

Con una presión inicial de polilla de aproximadamente 20 adultos por sala, se comenzó a aplicar los aislamientos Qu-M558 y Qu-B912 en dosis de 10^{13} conidias ha^{-1} . Para esto, las esporas puras de ambas aislaciones fueron mezcladas con 2 mL de aceite Sun spray y agua de pozo. Las soluciones de Qu-M558, Qu-B912 y Qu-M558+Qu-B912 fueron aplicadas al suelo y al follaje cada 4 días con una bomba de espalda de 15 L, por un periodo de 6 semanas.

Después de la última aplicación, se evaluó el ensayo, midiendo área foliar dañada y a las 3 semanas siguientes de terminada las aplicaciones se evaluó el porcentaje de fruto dañado por tratamiento. El diseño experimental fue un completo al azar con 3 tratamientos de solución de esporas y un tratamiento control sin inóculo, 4 repeticiones y 20 plantas de tomate como unidad experimental.

- Descripción de los ensayos en la V región.

❖ Invernadero de Xilema – Ensayo 1

Entre enero y mayo del 2003 se realizó una prueba en el invernadero de Xilema realizando el transplante de los plantines con cuatro hojas verdaderas, a macetas de 7 litros, con sustrato desinfectado. Las plantas se distribuyeron en 4 hileras de 48 plantas.

Cuando la mayoría de las plantas alcanzaron una altura de 70 cm y alrededor de 14 hojas, comenzó la inoculación con adultos de *Tuta absoluta*, provenientes de la crianza artificial mantenidas en dependencias de la Facultad de Agronomía. La inoculación se realizó una vez por semana, durante los meses de febrero a mayo del 2003.

- Tratamientos

Antes de la aplicación de los tratamientos se realizó un conteo de hojas de todas las plantas del invernadero, para determinar la presencia de *Tuta absoluta*. Para ello se eligió al azar una hoja por planta y se contó el número de larvas presentes. El número de larvas por hoja varió de 1 a 6, detectando la presencia de la plaga en todas las plantas. En ese momento se determinó la fecha de aplicación (16 de mayo del 2003) de los tratamientos.

El producto a aplicar correspondió a esporas de los hongos entomopatógenos, contenidas en bolsas de polietileno transparentes y selladas al vacío. Los tratamientos se describen a continuación:

- Tratamiento 1: solo agua.
- Tratamiento 2: B 912 (6×10^6 conidias /ml)
- Tratamiento 3: M 558 (6×10^6 conidias /ml)
- Tratamiento 4: B 912 (3×10^6 conidias /ml) + M 558 (3×10^6 conidias /ml)

- **Diseño estadístico**

El ensayo se condujo en bloques completamente al azar, con 4 bloques, es decir, 4 hileras, cada hilera con 4 repeticiones, 1 repetición por tratamiento.. El factor de bloqueo correspondió al número de larvas por hoja.

En cada tratamiento la unidad experimental correspondió a 12 plantas en parcelas de 2.1 m² (3.5 x 0.6 m) y la unidad de muestreo fue una hoja por planta en 10 plantas.

La aplicación se realizó con una bomba manual (marca Solo) con capacidad para 5 l y con una boquilla de abanico.

En el momento de la aplicación, se agregó 1 ml de aceite mineral (Sunspray). El efecto del aceite mineral es proteger las esporas de los rayos ultravioleta y humectarlas para que se distribuyan en la solución de la bomba y así permitir su distribución homogénea en la solución.

Para realizar la aplicación las plantas fueron removidas de su sitio original de manera de evitar la interferencia entre los tratamientos, dada por la deriva del producto y posteriormente se distribuyeron al azar dentro del invernadero.

- **Evaluaciones**

Efecto de los entomopatógenos sobre larvas de *Tuta absoluta*:

La muestra consistió en una hoja de la parte media de cada planta. En cada repetición se tomaron hojas de 10 de las 12 plantas que la conforman. Las plantas de cada extremo no fueron muestreadas para evitar la interferencia entre los tratamientos. Las 10 hojas por repetición se colocaron en bolsas de papel rotuladas.

La toma de muestras se realizó el mismo día de la aplicación de los tratamientos. Todas las muestras fueron llevadas al laboratorio de entomología de la PUCV, donde se almacenaron en bandejas plásticas selladas. Las bandejas se depositaron en baterías Flanders con una temperatura diurna máxima de $24^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y nocturna mínima de $11^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

En el pecíolo de cada hoja se colocó un algodón humedecido para mantener la hoja turgente por un mayor tiempo. El material vegetal que se utilizó para reponer las hojas senescentes de las bandejas, correspondieron a hojas de los mismos tratamientos. Se tomó la precaución de que estas hojas estuvieran libres de huevos y larvas.

El mismo día se realizó un conteo de larvas vivas de *Tuta absoluta* de cada muestra. Posteriormente, los conteos de larvas vivas y muertas, se realizaron diariamente durante 2 semanas.

Efecto de los entomopatógenos sobre huevos de *Tuta absoluta*:

Las muestras consistieron en 3 folíolos terminales de las hojas apicales y brotes de la planta, dado que la preferencia de ovipostura de la polilla es en brotes y hojas recién desplegadas. Solo se muestrearon cinco plantas del centro de cada parcela. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de entomología de la PUCV.

Los huevos fueron enumerados y marcados en cada folíolo. A medida que eclosaban, las larvas neonatas se depositaron en placas de petri junto con material vegetal del mismo tratamiento. Las placas fueron almacenadas en una sala con una temperatura máxima de $24^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante el día y una mínima de $11^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante la noche.

Se realizó un conteo diario de huevos y larvas neonatas vivas y muertas por 2 semanas.

❖ Invernadero de la Universidad – Ensayo 2

En esta oportunidad el ensayo se realizó posterior al de Xilema, en el mes de julio, donde se efectuaron los mismos tratamientos mencionados anteriormente con la única diferencia que el testigo de agua sola del ensayo anterior ahora llevaba aceite en la misma cantidad utilizada con las esporas.

La cantidad de plantas utilizadas fue en total 96 las cuales se distribuyeron al azar en grupos de 6 plantas correspondientes a cada una de las 4 repeticiones.

En cuanto a las evaluaciones en esta oportunidad se evaluó sólo sobre larvas del mismo modo mencionado anteriormente.

❖ Invernadero de Xilema – Ensayo 3

- **Invernadero:** semicircular de estructura metálica.
- **Medidas invernadero:** Ancho: 8,3 m
Largo : 20 m
Alto : 4,2 m
- **Ubicación:** Comuna de Quillota, sector San Pedro.
- **N° plantas:** Plantas tratadas: 120
- **N° plantas:** Plantas testigo: 120
- **Disposición de plantas:** Las plantas de tomate fueron plantadas en macetas, dispuestas en 6 hileras de 20 plantas, llevadas en dos ejes. Las plantas tratadas quedaron separadas de las plantas testigo en el interior del invernadero ocupando cada grupo un tercio de la superficie del invernadero en los extremos de este.

- **Inoculación:** Las plantas fueron colonizadas por Polilla del Tomate a partir de adultos que emergieron de pupas presentes en el suelo, por lo que las poblaciones de polillas en este invernadero fueron muy altas cuando las condiciones ambientales se lo favorecieron, como ocurrió en este periodo al acercarse el verano.
- **Frecuencia de los tratamientos:** Las plantas tratadas recibieron 5 aplicaciones con una frecuencia variable:
 - + primera aplicación = día 0
 - + segunda aplicación = al día 11
 - + tercera aplicación = al día 21
 - + cuarta aplicación = al día 35
 - + quinta aplicación = al día 45
- **Entomopatógeno:** El entomopatógeno utilizado para el control de la Polilla del Tomate sólo fue *Beauveria bassiana* – B912 y el 100% de la dosis utilizada fue el equivalente a 1×10^{13} conidias/ha, calculado para los 82 m² del sector tratado.
- **Botrytis:** Adicionalmente se utilizó en forma preventiva otro entomopatógeno, *Trichoderma*, para evitar la incidencia de *Botrytis*.
- **Aceite:** El aceite utilizado fue CITROLIV Miscible y la dosis fue de 0,5%. El mojamiento fue variando en función del crecimiento de las plantas.
- **Equipo de aplicación:** Bomba de espalda, con capacidad de 5 lt y una boquilla de cono con tamaño de gota pequeño (TG – 0,5).
- **Mojamiento:** En la primera aplicación se utilizó abundante agua hasta el chorreo, para ello se aplicó un mojamiento de:

*180 cc/planta, lo que equivale a 1500 lt/ha (8333 plantas/ha).

Sin embargo, para las aplicaciones siguientes se ajustó el volumen de solución lo más cercano a una aplicación comercial, es decir, asegurando un buen mojamiento pero sin llegar a chorreo.

El volumen de las aplicaciones fue aumentando a medida que las plantas crecían, quedando de la siguiente forma:

- *segunda aplicación: 30 cc/planta - 250 lt/ha
- *tercera aplicación: 40 cc/planta – 300 lt/ha
- *cuarta aplicación 40 cc/planta – 300 lt/ha
- *quinta aplicación 40 cc/planta – 300 lt/ha

- **Hora de aplicación:** Los horarios de las aplicaciones fueron siempre al atardecer entre las 17:00 y 18:00 horas, para evitar el daño de la luz ultravioleta (mas fuerte en horas de mayor luminosidad) y favorecer el desarrollo del hongo en un ambiente mas húmedo durante la noche.
- **Mediciones:** Se tomó una muestra de 24 hojas del tercio superior de la planta, (4 hojas por hilera en 6 hileras) pre-aplicación tanto a las plantas tratadas como al testigo. Luego se tomaron otras 24 hojas pos-aplicación sólo a las plantas tratadas. En las hojas se contabilizó el número de huevos y larvas de polilla presentes al día siguiente de la aplicación y se siguieron observando hasta los 10 días pos-aplicación, tiempo suficiente para que se expresara mortalidad por entomopatógeno.

❖ Invernadero de El Guindo – Ensayo 4

El ensayo se realizó en un invernadero comercial bajo las condiciones reales de producción en cuanto al tipo de invernadero y disposición de las plantas en terreno. Los manejos efectuados en las plantas, con la excepción del control de plagas y enfermedades en el sector del tratamiento, se llevaron en forma tradicional, de acuerdo a los parámetros productivos de la empresa.

Las características del ensayo fueron las siguientes:

- **Invernadero:** Invernadero de forma tradicional, módulo (2880 m^2) con 16 techos de 2 aguas cada techo y medidas de 6 m de ancho por 30 m de largo (180 m^2 cada techo), de estructura de madera. Para el ensayo se utilizó un techo del sector Hera Sur – Oeste, orilla del módulo Norte.
- **Medidas invernadero:**
 - Ancho: 6,0 m
 - Largo : 30 m
 - Alto : 4 m
- **Ubicación:** Comuna de Quillota, sector San Pedro.
- **N° plantas:** Plantas tratadas: 150, dispuestas en 3 mesas (50 plantas/mesa).
- **N° plantas:** Plantas testigo: 150, el mismo módulo, techo vecino del tratado separados entre ambos por malla ruschel.
- **Disposición de plantas:** Las plantas de tomate fueron plantadas en julio de 2003 en densidad de 50 plantas/mesa y en 3 mesas/techo y fueron llevadas en dos ejes. Las fertilizaciones y el resto de los manejos fuera del control de plagas y enfermedades las llevó la empresa en forma tradicional productiva. La primera aplicación de entomopatógenos se realizó a fines de septiembre.
- **Inoculación:** Debido a la época en que se realizó el ensayo no se realizó inoculación del invernadero con adultos de polilla esperando la llegada de la plaga en forma natural.
- **Plantas Testigo:** Recibieron aplicaciones tradicionales para el control de las enfermedades y plagas que se presentaron.
- **Frecuencia:** Las plantas recibieron 4 aplicaciones de entomopatógenos, la primera fue realizada en forma preventiva, entre el 25 de septiembre y el 30 de octubre de 2003, con el propósito de poblar de inóculo el ambiente. Las aplicaciones siguientes se realizaron con una frecuencia variable entre 10 y 14 días.

- No se continuó con las aplicaciones contra polilla después de octubre debido a que la población no superaba las 2 polillas/trampa/día y no se observaba daño. El registro de capturas de polilla fue el siguiente:

Fecha	Semana	Capturas sector	Capturas ensayo
Nº semana del mes		Prom. Nº machos/trampa/día	Prom. Nº machos/trampa/día
5ª julio	30	2,14	0,75
	31	1,6	2,0
	32	1,47	1,42
	33	0,875	0,75
	34	0,925	0,45
	35	0,952	1,0
	36	1,23	1,14
	37	1,03	1,2
	38	0,69	1,0
	39	0,814	1,8
	40	1,3	1,2
	41	1,12	1,3
	42	0,97	1,3
	43	0,91	1,7
	44	0,8	0,8
	45	1,27	1,3
	46	1,03	0,9
	47	0,97	0,28
	48	0,58	0,25
1ª diciembre	49	0,595	1,71
	50	2,1	1,8

	51	3,7	1,5
	52	2,4	2,3
	53	1,8	0,9
	54	2,9	1,5
	55	3,6	1,3
	56	5,2	2,1
	57	4,3	2,8
	58	2,9	0,9
	59	3,6	1,7
	60	5,8	2,8
	61	12,1	2,7
	62	9,3	2,9
	63	4,5	4,3
	64	7,8 (*)	5,9 (*)
	65	0,7	0,6

*Nota: Aplicación de pesticida químico contra Polilla del tomate.

- **Entomopatógeno:** En esta oportunidad sólo se utilizó para el control de la Polilla del Tomate *Beauveria bassiana* – B912 aplicando este hongo sólo al follaje en dosis equivalente a la dosis/ha de 1×10^{13} conidias/ha y calculado para los 180 m².
- **Botrytis:** Adicionalmente se utilizó en forma preventiva otro entomopatógeno, *Trichoderma*, para evitar la incidencia de *Botrytis*, aplicado sólo al follaje.
- **Aceite:** El aceite utilizado fue CITROLIV Miscible y la dosis de 0,5%.
- **Equipo de aplicación:** Se aplicó con una bomba de espalda (15 lt) y posteriormente con una de 5 lt con boquilla de cono con tamaño de gota pequeño (TG – 0,5).

- **Mojamiento:** Los mojamientos fueron variando en función del tamaño de las plantas, del equipo utilizado y tipo de boquilla, quedando de la siguiente forma:

N° de aplicación	Mojamiento cc/planta	Mojamiento lt/ha
1	30	250
2	40	333
3	40	333
4	40	333

- **Hora de aplicación:** Los horarios de las aplicaciones fueron siempre al atardecer entre las 17:00 y 18:00 horas para evitar, de esta manera, el daño de la luz ultravioleta (más fuerte en horas de mayor luminosidad) y favorecer el desarrollo del hongo en un ambiente más húmedo durante la noche. Sólo en una oportunidad se aplicó en la mañana con día nublado.
- **Otros productos utilizados:** Para el control de plagas en el sector tratado con entomopatógenos se utilizó adicionalmente Quix en dosis de 250 –300 cc/100lt para el control de adultos de Mosquita blanca en dos oportunidades durante el mes de septiembre. Para el control de enfermedades en el mismo sector se tuvo que recurrir a un fungicida para control de Oidio, aplicándose en el mes de enero el producto Horizon en dosis de 100 gr/100lt. Sin embargo, no se logró detener el ataque por lo que no se pudo continuar con el uso de entomopatógeno en el sector tratado. Para el sector testigo y tratado se anexan aplicaciones efectuadas de otros productos:

* Otros productos, dosis y mojamientos utilizados en el sector testigo y tratado:

Fecha	Sector Testigo	Sector Tratado	Producto	Dosis	Control para:	Mojamiento lt/ha	Equipo de aplicación
21/7/03	Si	No	SUNFIRE	30 cc/100lt	Polilla del tomate preventivo	116,27	Manual, bomba de espalda
11/8/03	Si	Si	SCORE 250	60 cc/100lt	Oidio, preventivo	116,27	Manual, bomba de espalda
18/8/03	Si	No	PHYTON 27	100 cc/100lt	Oidio, preventivo	116,27	Manual, bomba de espalda
26/8/03	Si	Si	QUADRIS	60 cc/100lt	Tizón, sólo al hoyo de plantación	116,27	Manual, bomba de espalda
8/9/03	Si	No	HORIZON ADMIRAL	100 gr/100lt 80 cc/100lt	Oidio, preventivo Mosquita blanca, ninfas	210,21	Pulverizadora Lévera.
12/9/03	Si	No	POLIVEN 50	80 gr/100lt	Phytophthora, dirigido, cuello	180,18	Pulverizadora Lévera.
16/9/03	Si	Si	QUIX	250 cc/100lt	Mosquita blanca, adulto	343,28	Pulverizadora Lévera.
24/9/03	Si	No	CASCADE POLIVEN 50	100 cc/100lt 60 gr/100lt	Mosquita blanca, ninfas Oidio, preventivo	300,3	Pulverizadora Lévera.
29/9/03	Si	No	CONFIDOR	60 cc/100lt	Mosquita blanca, adulto	343,69	Pulverizadora Lévera.



30/9/03	Si	Si	QUIX	300 cc/100lt	Mosquita blanca, adulto	833,33	Pulverizadora Lévera
7/10/03	Si	No	HORIZON	100 gr/100lt	Oidio preventivo	405,4	Pulverizadora Lévera
14/10/03	Si	No	ADMIRAL	80 cc/100lt	Mosquita blanca, ninfas	555,55	Pulverizadora Lévera
21/10/03	Si	No	BAYLETON	60 gr/100lt	Oidio preventivo	540,4	Pulverizadora Lévera
27/10/03	Si	No	AMISTAR	60 cc/100lt	Tizón	491,8	Pulverizadora Lévera
			MORPILAN	60 gr/100lt	Mosquita blanca		
5711/03	Si	No	INSEGAR	60 gr/100lt	Mosquita blanca, ninfas	630,25	Pulverizadora Lévera
18/11/03	Si	No	POLIVEN 50	60 gr/100lt	Oidio preventivo	720,29	Pulverizadora Lévera
12/12/03	Si	No	HORIZON	100 gr/100lt	Oidio, control	810,32	Pulverizadora Lévera
18/12/03	Si	No	ESCORE 250	60 cc/100lt	Oidio, control	1041,25	Pulverizadora Lévera
8/1/04	Si	No	AZUFRE	300 gr/100lt	Oidio, control	1241,01	Pulverizadora Lévera
			POLIVEN 50	60 gr/100lt			
22/1/04	Si	Si	HORIZON	100 gr/100lt	Oidio, control	1420,45	Pulverizadora Lévera
			APLAUD	100 gr/100lt	Mosquita blanca, ninfas		
5/2/04	Si	Si	AZUFRE	300 gr/100lt	Oidio, control	1567,94	Pulverizadora Lévera

			POLIVEN 50	60 gr/100lt			
18/3/04	Si	Si	EVISECT	100 gr/100lt	Polilla del tomate, bajar presión. Mosquita blanca	746,26	Pulverizadora Lévera

- **Mediciones:** En cada aplicación se tomaron muestras de hojas para observar la presencia de huevos y larvas de polilla.

❖ Invernadero de Xilema – Ensayo 5.

Corresponde al mismo invernadero de Xilema y se planteó como continuación en base a los resultados anteriores. La frecuencia de aplicación se aumentó al doble al igual que las dosis del entomopatógeno. Por otra parte se comenzaron a realizar aplicaciones del entomopatógeno al suelo. En relación al mojamiento se procuró un buen cubrimiento de la superficie de la hoja mojando sobre todo el envés. Para ello se utilizaron dos equipos, y/o boquillas nuevas.

Las características del ensayo fueron las siguientes:

- **Nº plantas utilizadas:** Plantas tratadas: 90
Plantas testigo: 90
- **Disposición de plantas:** Las plantas de tomate fueron establecidas en diciembre de 2003 y la primera aplicación comenzó a la primera flor el 8 de enero de 2004 (plantas de 30 cm), ubicadas en macetas, dispuestas para el sector tratado, en 6 hileras; fueron guiadas en dos ejes.
- **Inoculación:** Las plantas fueron colonizadas por adultos de Polilla del Tomate provenientes de pupas presentes en el suelo por lo que las poblaciones de polillas alcanzadas en este invernadero fueron muy altas cuando las condiciones

- ambientales se lo favorecieron, como ocurrió en este periodo, sobre todo en verano.
- **Plantas Testigo:** No recibieron aplicaciones durante todo el ensayo. Recibieron agua sola cuando se requirió aumentar el volumen de mojamiento al sector tratado, para determinar el mojamiento por planta.
- **Frecuencia:** Las plantas tratadas recibieron 21 aplicaciones en 3 meses cuya frecuencia se aumentó respecto al ensayo anterior, con un rango de 3-7 días entre aplicación.
- **Entomopatógeno:** En esta oportunidad se utilizaron dos entomopatógenos combinados para el control de la Polilla del Tomate *Beauveria bassiana* – B912 y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.- M558 y la dosis utilizada fue variando de la siguiente manera:

FECHA	HONGOS Equivalente Dosis/ha	Aplicación Foliar	Aplicación al Suelo
8/1/04	1×10^{13} conidias/ha	Si	No
12/1 /04	1×10^{13} conidias/ha	Si	Si
16/1/04 al 19/3/04	$1,5 \times 10^{13}$ conidias/ha	Si	Si
22/3/04 al 29/4/04	5×10^{13} conidias/ha	Si	Si

Nota: La dosis equivalente a conidias /ha se refiere a dosis establecidas para cultivos bajos. Como el cultivo de tomate evaluado es el que se lleva en altura, guiado en ejes pudiendo alcanzar más de 2 metros de altura de la planta, las dosis fueron aumentando progresivamente, a lo cual se sumó la alta presión de polilla hacia fines de marzo.

- **Botrytis:** Adicionalmente se utilizó en forma preventiva otro entomopatógeno, *Trichoderma*, para evitar la incidencia de *Botrytis*, aplicado tanto foliarmente como al suelo. Se aplicó, preventivamente, entre las aplicaciones N° 1 y 3 (entre el 8 al 16 de enero).
- **Aceite:** El aceite utilizado fue CITROLIV Miscible y la dosis fue del 0,5%.
- **Detergente:** El detergente utilizado fue Quix, en dosis de 1 gota /200ml.
- **Equipo de aplicación:** En este ensayo se utilizaron dos equipos, entre la aplicación N° 1 y 5 se aplicó con la Ultra Bajo Volumen (UBV). Se pudo usar mientras las plantas eran pequeñas. Este equipo tiene la particularidad de distribuir muy bien las gotas, en muchas gotas pequeñas abarcando casi el 100% de la superficie de la hoja y se dirigió de tal manera de que se distribuyera tanto por el haz como el envés de la hoja. Luego, se cambió a bomba de espalda tradicional, con capacidad de 5 lt y una boquilla de cono con tamaño de gota pequeño (TG – 0,5), usada entre la aplicación N° 6 y 7. Sin embargo, entre las aplicaciones 8 a la 21 se cambió a boquilla doble (dos boquillas de cono) para mejorar el mojamiento en plantas con mayor follaje y altura.
- **Mojamiento:** Los mojamientos fueron variando en función del tamaño de las plantas, del equipo utilizado y tipo de boquilla, quedando de la siguiente forma:

N° de aplicación	Mojamiento cc/planta	Mojamiento lt/ha
1	26	220
2	26	220
3	36	300
4	52	433

5	52	433
6	41	342
7	55	458
8	89	742
9	89	742
10	89	742
11	117	975
12	117	975
13	135	1125
14	135	1125
15	135	1125
16	135	1125
17	135	1125
18	135	1125
19	135	1125
20	135	1125
21	160	1333

- **Hora de aplicación:** Los horarios de las aplicaciones fueron siempre al atardecer entre las 17:00 y 18:00 horas para evitar el daño de la luz ultravioleta (más fuerte en horas de mayor luminosidad) y favorecer el desarrollo del hongo en un ambiente mas húmedo durante la noche.

- **Otros productos utilizados:** Fue necesario realizar control de Oidio hacia fines de marzo. Se aplicó un producto biológico (SERENADE) en base a *Bacillus subtilus* en dosis de 100 gr/100lt. Sólo se necesitó una aplicación para lograr el control del Oidio.
- **Mediciones:** Se realizaron mediciones de niveles de daño evaluado en el tercio superior de la planta entre las dos últimas inflorescencias. Los datos se separaron en dos grupos:
 - N° de plantas con menos de 4 hojas con daño.
 - N° de plantas con mas de 4 hojas con daño.
- Por otra parte se tomaron muestras, cada dos aplicaciones, de 6 hojas (apicales y basales) pre-aplicación y 6 hojas post-aplicación a las plantas tratadas y a las plantas testigo. En las hojas se contabilizó el número de huevos y larvas de polilla presentes al día siguiente de la aplicación y se siguieron observando hasta los 10 días pos-aplicación, tiempo suficiente para que se expresara mortalidad por entomopatógeno.
- En las aplicaciones intermedias sólo se realizó un recuento de polilla en hojas recolectadas postaplicación.
- Una vez que la fruta estaba lista para cosecha (fruta con cambio de color), se fue cosechando separadamente el sector tratado del testigo para luego registrar el peso y evaluar en cada fruto la presencia de daño por polilla y de larvas de polilla al interior de la fruta, para ello se cortó cada fruto en láminas delgadas hasta encontrar larvas, luego se registró el número de larvas por fruta evaluada en cada oportunidad de cosecha.

Las características del ensayo fueron las siguientes:

- **Invernadero:** Invernadero de forma tradicional, módulo (720 m^2) con 4 techos de 2 aguas cada techo y medidas de 6 m de ancho por 30 m de largo (180 m^2 cada techo), de estructura de madera. Para el ensayo se utilizó el módulo completo, 2 techos para el sector tratado y 2 techos para el sector testigo.
- **Medidas invernadero:** Por techo: Ancho: 6,0 m
Largo : 30 m
Alto : 4 m
- **Ubicación:** Comuna de Hijuelas, sector Hualcapo.
- **N° plantas:** Plantas tratadas:450, dispuestas en 8 mesas (150 plantas/mesa).
- **N° plantas:** Plantas testigo:450, en el mismo módulo, sin separación, sólo un pasillo de 1 m de distancia.
- **Disposición de plantas:** Las plantas de tomate fueron plantadas en invierno para ser cosechadas en primavera – verano (hasta mediados de enero de 2004). La primera aplicación se realizó el 16 de enero.
- **Inoculación:** Las plantas no recibieron inoculación con Polilla del tomate debido a que es un cultivo de término de la temporada y el productor no controló la polilla ni otras plagas como la mosquita blanca, muy abundante al inicio y término del ensayo. La presión de polilla fue alta, principalmente en plantas de la periferia y fue en aumento hacia todas las plantas hacia el otoño.
- **Plantas Testigo:** No recibieron aplicación de tratamientos durante todo el ensayo.
- **Frecuencia:** Las plantas recibieron 10 aplicaciones en 1,5 meses a partir del 16 de enero y hasta el 1 de marzo. La frecuencia fue variable entre 3-8 días.

- **Entomopatógeno:** En esta oportunidad se utilizaron dos entomopatógenos combinados para el control de la Polilla del Tomate *Beauveria bassiana* – B912 y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.- M558 y la dosis utilizada fue única en equivalencia a 1×10^{13} conidias/ha, calculada para los 360 m² del sector tratado.
- **Botrytis:** No se aplicó nada preventivo para Botrytis y a pesar que la densidad de plantas es elevada no se presentó la enfermedad, posiblemente debido a la ventilación.
- **Aceite:** El aceite utilizado fue CITROLIV Miscible y la dosis fue al 0,5%.
- **Detergente:** El detergente utilizado fue Quix, en dosis de 1 gota /200ml
- **Equipo de aplicación:** En este ensayo se utilizó un solo equipo siendo éste una bomba de espalda tradicional de 15 lt con una sola boquilla de cono en las primeras 2 aplicaciones, luego se cambió a doble boquilla de cono hueco, mejorando con ello el mojamiento y el tiempo de aplicación.
- **Mojamiento:** El mojamiento fue el mismo en todas las aplicaciones, aplicando 60 lt al follaje en todo el sector tratado, lo que equivale a 50 cc/planta , o bien, 1666 lt/ha. El mojamiento al follaje se distribuyó en el tercio superior de las plantas (altura cercana a los 2 metros) y se ocupó otros 30 lt para asperjar al suelo entre las mesas.
- **Hora de aplicación:** Los horarios de las aplicaciones fueron siempre al atardecer entre las 18:00 o 19:00 horas y hasta las 21 horas, evitando así el daño de la luz ultravioleta (más fuerte en horas de mayor luminosidad) y favoreciendo el desarrollo del hongo en un ambiente mas húmedo durante la noche.
- **Otros productos utilizados:** Fue necesario realizar control de Oidio hacia fines de marzo. Se aplicó un producto biológico de nombre comercial SERENADE (*Bacillus subtilis*) en dosis de 100 gr/100lt. Esta aplicación fue de carácter curativo y preventivo, curativo para plantas que presentaban el hongo (15 plantas del testigo) y preventivo para el resto de las plantas que no presentaban el micelio. Sólo fue necesaria una aplicación para el control del Oidio.

- **Mediciones:** Se realizaron mediciones de niveles de daño, siempre evaluado en el último tercio de la planta entre las dos ultimas inflorescencias por ser éste el sector mas atacado por polilla. Los datos se agruparon en dos categorias:
 - N° de plantas con menos de 4 hojas con daño.
 - N° de plantas con mas de 4 hojas con daño.
- Se tomaron como muestras 6 hojas (apicales y basales) pre-aplicación y 6 hojas (apicales y basales) pos-aplicación tanto a las plantas tratadas como al testigo. En las hojas se hizo un recuento de huevos y larvas de polilla presentes al día siguiente a la aplicación y se siguieron observando hasta los 10 días pos-aplicación, tiempo suficiente para que se expresara mortalidad por entomopatógeno.
- Paralelamente se tomó muestra posaplicación de 6 hojas (apicales y basales) al sector tratado en las aplicaciones intermedias que no fueron medidas como se señaló en el punto anterior. Esta evaluación fue adicional en la obtención de información de evaluación de larvas y huevos afectados por entomopatógenos.
- Una vez que la fruta estaba lista para cosecha, (fruta con cambio de color), se fue cosechando separadamente el sector tratado del testigo para luego registrar el peso y evaluar en cada fruto la presencia de daño por polilla y de larvas de polilla al interior de la fruta. Para ello se cortó cada fruto en láminas delgadas hasta encontrar larvas, luego se registró el número de larvas por número de fruta evaluada en cada oportunidad de cosecha.

ACTIVIDAD 10. Evaluación del control.

Se establecieron en invernadero 56 plantas de tomate de la variedad Fortaleza dispuestas sobre macetas plásticas de 650 cc de capacidad, las que fueron fertilizadas con tres parcialidades de nitrato de sodio y regadas diariamente.

Se inocularon plantas utilizándose suspensiones de 1.13×10^7 conidias ml^{-1} . Para inocular las plantas cada uno de los aislamientos se suspendió en 0.3 ml de aceite Sunspray y 490 ml de agua de pozo estéril más 0.3 ml de humectante (Twin 80) en las cantidades de 0.10 gramos de Qu-M558, 0.25 gramos de Qu-B912 y para el tratamiento combinado 0.12 gramos de Qu-B912 y 0.05 de Qu-M558. Posteriormente se llevó al agitador mecánico por 30 minutos para aplicar sobre las plantas utilizando un pulverizador manual. Al tratamiento testigo se le aplicó agua estéril más 0.3 ml de aceite mineral (Sun pray) y 0.3 ml de humectante (Twin 20).

Se realizaron evaluaciones diarias, colectándose 10 hojas cada 24 horas post aplicación de cada una de los aislamientos y de un testigo por un período de 10 días. Sobre las hojas inoculadas se colocó un huevo a punto de eclosionar de *T. absoluta*, de forma que al emerger la larva se inocule con las del hongo antes de ingresar al mesófilo de la hoja, evaluándose diariamente la mortalidad de las larvas.

Para esta evaluación se utilizó un diseño experimental completo al azar con cuatro tratamientos y diez repeticiones. Para cada aislamiento se calculó el porcentaje de mortalidad de larvas, los que fueron sometidos a análisis de varianza y separación de medias mediante la prueba de Duncan.

PROBLEMAS EN LA METODOLOGIA

Se mantuvo una crianza de polilla del tomate en invernadero de Xilema, sin embargo, problemas climáticos ocurridos en el invierno 2002 destruyeron la crianza la que debió ser reiniciada una vez solucionados los daños al invernadero.

Otro problema presentado estuvo relacionado con la identificación de bacterias del genero *Bacillus*, específicamente la especie *B. thuringiensis*. Esto principalmente por que los análisis se efectuaron fuera de Quilamapu, lo que implicó enviar muestras de todas las colonias encontradas en las distintas muestras de suelo para su identificación.

Otra dificultad que se debió sortear en la etapa final del proyecto, fue la falta de poblaciones adecuadas para las evaluaciones en cultivos comerciales de tomate. Lo anterior tiene relación con el plan de trabajo establecido y los productos empleados en el manejo de plagas y enfermedades los que no se complementan con el uso de microorganismos como los hongos entomopatógenos. Esto toma especial énfasis cuando en algunos cultivos se aplicaban fungicidas para el control de enfermedades como Botrytis y Oidio, que en su mayoría eran productos químicos dañinos para los hongos entomopatógenos.

Para solucionar los problemas mencionados anteriormente se establecieron cultivos de tomates en invernaderos de vidrio con calefacción en INIA- Quilamapu y en invernadero de policarbonato en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso que unido al reinicio de la crianza en Xilema permitió mantener la crianza de polilla durante todo el año.

Así también se establecieron cultivos de tomate en maceteros para realizar las evaluaciones del control de polilla sobre plantas tratadas con los aislamientos seleccionados.

Las evaluaciones sobre el cultivo se realizaron en plantaciones de tomates establecidas en invernaderos con malla antiafido ubicados en el CRI Quilamapu de Chillán.

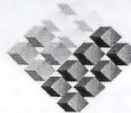
Dado los numerosos aislamientos de Hongos entomopatógenos evaluados (139 aislaciones) y la efectividad de los aislamientos seleccionados para el control de la polilla del tomate, se concentró el esfuerzo en ellos y no en la colecta y cultivo de *B. thuringiensis*.

Para resolver el problema de bajas poblaciones en cultivos comerciales se realizaron ensayos en el invernadero en que Xilema mantenía la crianza de polilla.

4. Comparación de las actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos, con las programadas (Cuadro 1).

Cuadro N° 1: Actividades y tareas programadas y ejecutadas.

Actividad Programada	Objetivo	Actividad Ejecutada	Cambios Ejecutados
Crianza de <i>T. absoluta</i>	Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos y <i>B. thuringiensis</i> específicos para el control de <i>Tuta absoluta</i> . Formulación de un biopesticida de largo efecto residual y capaz de proteger al organismo entomopatógeno contra la desecación y radiación UV.	Crianza de polilla en invernaderos de tomate en Xilema, Quillota y en INIA-Quilamapu Chillan.	La crianza se amplió a la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso e INIA Quilamapu Chillan. Por razones climáticas
Colecta de terreno de <i>B. thuringiensis</i> y hongos entomopatógenos.	Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos y <i>B. thuringiensis</i> específicos para el control de <i>Tuta absoluta</i> .	Colecta de 129 muestras de suelo en las regiones V y Metropolitana	Sin cambios. Se amplió a toma de muestra de suelo en sectores intervenidos por actividad humana.
Aislamiento y criopreservación de hongos entomopatógenos y <i>B. thuringiensis</i> .	Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos y <i>B. thuringiensis</i> específicos para el control de <i>T. absoluta</i> .	Aislamiento de 26 aislaciones de HEP y 1 de <i>B. thuringiensis</i>	Sin cambios. La mayoría de los aislamientos se obtuvieron del suelo.



Evaluación de organismos entomopatógenos encontrados y de la colección INIA de hongos entomopatógenos.	Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos y <i>B. thuringiensis</i> específicos para el control de <i>T. absoluta</i> .	Evaluación de 139 aislamientos de HEP sobre huevos y larvas de la polilla.	Sin cambios.
Pruebas con insectos benéficos	Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos y <i>B. thuringiensis</i> específicos para el control de <i>Tuta absoluta</i> . Evaluación de la efectividad de <i>B. thuringiensis</i> y hongos entomopatógenos en condiciones de terreno y su complementariedad con los insectos benéficos <i>Trichogramma</i> sp., <i>Encarsia formosa</i> , <i>Bombus terrestris</i> y <i>Apis mellifera</i> .	Aplicación de los aislamientos seleccionados sobre adultos, huevos sanos y parasitados por <i>Thichogramma</i> , y <i>Encarsia</i> , para evaluar viabilidad, capacidad parasítica y emergencia de adultos además de aplicaciones sobre colmenas de abejas y abejorros.	Sin cambios.
Prueba de dosis y tiempo letal.	Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos y <i>B. thuringiensis</i> específicos para el control de <i>Tuta absoluta</i> .	Aplicación de los aislamientos seleccionados sobre huevos y larvas en diferentes dosis.	Sin cambios.
Elaboración de una formulación de biopesticida resistente a la desecación.	Formulación de un biopesticida de largo efecto residual y capaz de proteger al organismo entomopatógeno contra la desecación y radiación UV.	Evaluación de la viabilidad de las esporas almacenadas con distintos contenidos de humedad selladas con y sin vacío por un período de seis meses.	Sin cambios.
Elaboración de una formulación de biopesticida resistente a la luz ultravioleta	Formulación de un biopesticida de largo efecto residual y capaz de proteger al organismo entomopatógeno contra la desecación y radiación UV.	Evaluación de la germinación de esporas de los aislamientos seleccionados para el control de la polilla formulados con distintos protectores solares y expuestos a radiación UV a diferentes tiempos.	Sin cambios.
Evaluaciones en el cultivo.	Evaluación de la efectividad de <i>B. thuringiensis</i> y hongos entomopatógenos en condiciones de terreno y su complementariedad con los insectos benéficos <i>Trichogramma</i> sp., <i>Encarsia formosa</i> , <i>Bombus terrestris</i> y <i>Apis mellifera</i> .	Aplicación de las esporas sobre plantas de tomate en invernaderos inoculados con polilla y en cultivos comerciales	Sólo se hicieron evaluaciones de campo bajo invernadero. Se amplió a 8 ensayos entre Chillan y Quillota



0	Evaluación del control	Evaluación de la efectividad de <i>B. thuringiensis</i> y hongos entomopatógenos en condiciones de terreno y su complementariedad con los insectos benéficos <i>Trichogramma</i> sp., <i>Encarsia formosa</i> , <i>Bombus terrestris</i> y <i>Apis mellifera</i> .	Aplicación de las esporas sobre plantas de tomate en invernaderos inoculados con polilla y en cultivos comerciales. Aplicación de los aislamientos y evaluación de la mortalidad de larvas a través del tiempo.	Sin cambios.
1	Elaboración de informes técnicos	Transferir el conocimiento adquirido a los agricultores, asesores de cultivos de tomate, ingenieros agrónomos y estudiantes de Agronomía.	Entrega de 5 Informes con resultados parciales obtenidos durante la realización del proyecto.	Sin cambios.
2	Participación en seminarios	Transferir el conocimiento adquirido a los agricultores, asesores de cultivos de tomate, ingenieros agrónomos y estudiantes de Agronomía.	Exposición de los resultados obtenidos en Congresos de Entomología, realización de charlas técnicas, un seminario dirigido a profesionales y elaboración de 2 tesis de grado en la PUCV.	Sin cambios.
3	Informe final	Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos y <i>B. thuringiensis</i> específicos para el control de <i>Tuta absoluta</i> . Formulación de un biopesticida de largo efecto residual y capaz de proteger al organismo entomopatógeno contra la desecación y radiación UV. Evaluación de la efectividad de <i>B. thuringiensis</i> y hongos entomopatógenos en condiciones de terreno y su complementariedad con los insectos benéficos <i>Trichogramma</i> sp., <i>Encarsia formosa</i> , <i>Bombus terrestris</i> y <i>Apis mellifera</i> . Transferir el conocimiento adquirido a los agricultores, asesores de cultivos de tomate, ingenieros agrónomos y estudiantes de Agronomía.	5 Informes parciales entregados durante el desarrollo del proyecto y el informe final.	Sin cambios.

5. RESULTADOS DEL PROYECTO

ACTIVIDAD 1. Crianza de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae).

A partir de las liberaciones realizadas en el invernadero existente en Xilema, Quillota se realizó la reproducción de polillas. Tal como se menciona en la literatura, las hembras colocaron huevos en el follaje y las larvas se desarrollaron en galerías al interior de las hojas. A partir del 21 de marzo de 2002 se dio inicio a la colecta de hojas con larvas del estado mas avanzado para luego disponerlas sobre una batería y esperar el desarrollo de pupas.

Una vez obtenidas las pupas estas fueron enviadas al INIA Quilamapu en Chillan donde se obtuvieron los adultos de polilla del tomate, para realizar crianza artificial de manera de disponer de huevos y larvas en toda época del año y así desarrollar las diferentes evaluaciones del proyecto.

ACTIVIDAD 2. Colecta de terreno de *B. thuringiensis* y hongos entomopatógenos.

Durante el desarrollo del proyecto se evaluaron 129 muestras de suelo de las cuales se colectaron un total de 26 organismos entomopatógenos, principalmente hongos. De las especies colectadas se obtuvieron 4 aislamientos pertenecientes al genero *Metarhizium* y 22 aislamientos del genero *Beauveria*. La detección de bacterias del genero *Bacillus* permitió colectar una cepa de la especie *Bacillus thuringiensis*.

El origen y las características del lugar de recolección de las diferentes especies de entomopatógenos colectados se resumen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Resultado de las detecciones.

ENTOMOPATOGENO	LOCALIDAD	SECTOR CULTIVO	SECTOR ALEDAÑO	REGION
<i>Beauveria bassiana</i>	San Pedro, Qta.			V
	Melipilla, Stgo.			RM
	Pocochay, Quillota			V
	San Pedro, Qta.	X		V
	San Pedro, Qta.	X		V
	Pocochay, Qta.		X	V
	Mallarauco		X	V
	San Pedro, Qta.	X		V
	San Pedro, Qta.	X		V
	El Maitén, Melipilla, Pomaire	X		RM
	Parcela El Maiten, Pomaire		X	RM
	San Pedro, Qta.	X		V
	Pocochay, Qta.		X	V
	San Pedro, Qta.		X	V
	San Pedro, Qta.		X	V
	San Pedro, Qta.	X		V
	2 ^a		X	
	7 ^a		X	
	San Javier, Talca		X	VII
	Cajon Grande Bosque de Boldo		X	V
	Cajón Grande, La Campana		X	V
	Cajón Grande, La Campana		X	V
<i>Metarhizium anisopliae</i>	San Pedro, Qta.		X	V
	Predio 3, San Pedro	X		V
	1C	X		
	9C	X		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Cajon Grande, La Campana		X	V

Se detectaron entomopatógenos en las regiones V, VI y Metropolitana tanto en cultivo al aire libre como bajo invernadero. El género predominante fue *Beauveria* detectado en 22 muestreos, principalmente en muestras tomadas de sectores aledaños al cultivo. En menor frecuencia se detectó el género *Metarhizium*, presente sólo en cuatro muestreos de la V Región, tres fueron obtenidos desde muestras de suelo de cultivo y uno en sector aledaño al cultivo.

Solo se colectó una cepa de *B. thuringiensis* obtenida desde una muestra de suelo de bosque de boldo ubicado en el sector de La Campana, V región.

ACTIVIDAD 3. Aislamiento y criopreservación de hongos entomopatógenos y *Bacillus thuringiensis*.

Todas las aislaciones de los diferentes entomopatógenos colectados fueron identificadas y pasaron a formar parte de la colección de INIA-Quilamapu. Actualmente se encuentran 2 copias de cada aislamiento, almacenadas en frío a 5°C y en nitrógeno líquido.

ACTIVIDAD 4. Evaluación de organismos entomopatógenos encontrados y de la colección INIA de hongos entomopatógenos.

Para la evaluación sobre larvas, se utilizaron 12 aislamientos (5 de *Metarhizium* y 7 de *Beauveria*) los que fueron comparados a través de los índices de mortalidad (IM) y de esporulación (IE).

Los mayores índices de mortalidad de larvas se alcanzaron a los 10 días con las aislaciones Qu-M173c y Qu-M499, las que produjeron mortalidades del 80 y 60% respectivamente. Sin embargo solo Qu-M499 superó el percentil 0.9 tanto para IM como para IE (Figura 3a).

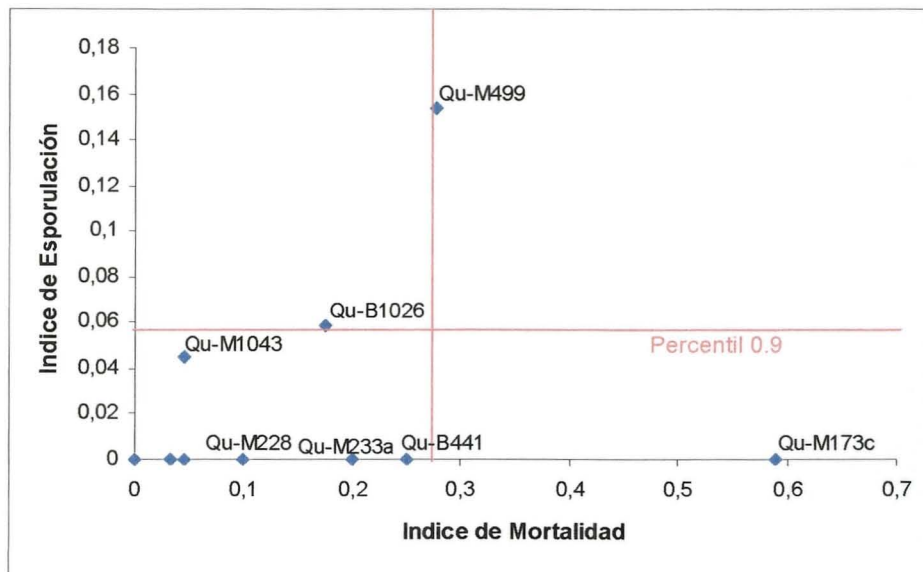


Figura 3a: Mortalidad y Esporulación en larvas de *T. absoluta* inoculadas con *Metarhizium* y *Beauveria*.

Las larvas parasitadas presentaron síntomas iniciales como: tonalidad pálida de la cutícula acompañada de manchas oscuras, escasa movilidad y pérdida de apetito. Después de incubadas, las larvas parasitadas, presentaron desarrollo de micelio y emisión de esporas. La capacidad de esporulación del hongo sobre el cadáver del insecto, es un factor importante de considerar en la selección de cepas, ya que ello contribuye a la diseminación del hongo en terreno.

Como las larvas en estados iniciales de desarrollo, se encuentran preferentemente bajo la epidermis de la hoja, dificultando el contacto entre las esporas del hongo y su hospedero, se realizaron nuevas pruebas de patogenicidad con *Beauveria* y *Metarhizium* aplicados sobre huevos de *T. absoluta*.

La selección de los mejores aislamientos de hongos se basó en la mortalidad y en la capacidad de esporulación de los hongos en los huevos muertos. De los 73 aislamientos de *B. bassiana* evaluados, solo 10 causaron mortalidad igual o superior al 50% (Cuadro 3a y 3b) de las cuales 3 presentaron la mas alta esporulación de la prueba (60%) (QuB911, QuB912 y QuB928) (Figura 3b). Del total de aislamientos probados destacan 5 que no causaron mortalidad de huevos, lo cual confirma la especificidad de los hongos entomopatógenos.

Los huevos muertos se caracterizaron por presentar un cambio en la tonalidad, tornándose mas oscuros, al cabo de dos días de incubados se observaron los primeros signos del hongo, los que correspondieron a micelio blanquecino que al tercer día se cubrieron de esporas blancas, características de la especie.

Los mejores aislamientos en cuanto a mortalidad y esporulación fueron Qu-B911, Qu-B912 originarios de Isla de Pascua y Qu-B928 extraído desde una larva de *Asynonychus cervinus*, ($P=0,512$).

En el caso de los 66 aislamientos de *M. anisopliae* evaluados, 54 fueron efectivos en el control de huevos de *T. absoluta*, en tanto que los 12 aislamientos restantes no provocaron mortalidad de huevos, al igual que el testigo (Cuadro 4b). Con el aislamiento Qu-M558, originario de Purránque, Osorno, X Región, se alcanzó la mayor mortalidad y esporulación, y fue estadísticamente diferente al testigo (Figura 3c). Los huevos muertos y parasitados por *Metarhizium* adquirieron una coloración blanco grisácea y al tercer día de incubados se produjo la emisión de esporas de color verde propio de esta especie.

Cuadro 3a. Porcentajes y Probabilidad de mortalidad y esporulación de acuerdo a test de χ^2 para huevos de *T. absoluta* inoculados con diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana*.

Aislamiento	Mortalidad (%)	Probabilidad de mortalidad	Esporulación (%)	Probabilidad de esporulación
Qu-B193	50	0,5637	30	0,6744
Qu-B204	50	0,5637	30	0,6744
Qu-B215	40	0,6171	30	0,6744
Qu-B217	20	0,7389	20	0,7389
Qu-B221	40	0,6171	40	0,6171
Qu-B255	40	0,6171	40	0,6171
Qu-B261	40	0,6171	20	0,7389
Qu-B272	20	0,7389	20	0,7389
Qu-B273	30	0,6744	10	0,8185
Qu-B294	30	0,6744	20	0,7389
Qu-B295	30	0,6744	20	0,7389
Qu-B 297	30	0,6744	30	0,6744
Qu-B299	30	0,6744	20	0,7389
Qu-B300	20	0,7389	20	0,7389
Qu-B 303	60	0,5127	10	0,8185
Qu-B 308	40	0,6171	20	0,7518
Qu-B331	30	0,6744	0	0,6744
Qu-B333	30	0,6744	30	0,6744
Qu-B336	50	0,5637	40	0,6171
Qu-B342	20	0,7389	0	0,7389
Qu-B 348	0	0,9994	0	0,9994
Qu-B351	30	0,6744	20	0,7389
Qu-B 392	30	0,6744	30	0,6744
Qu-B 393	20	0,7389	20	0,7389
Qu-B 400	20	0,7389	20	0,7389
Qu-B 408	30	0,6744	30	0,6744
Qu-B 420	20	0,7389	20	0,7389
Qu-B 422	10	0,8185	10	0,8185
Qu-B 427a	30	0,6744	30	0,6744
Qu-B 427b	40	0,6171	40	0,6171
Qu-B 428	50	0,5637	50	0,6171
Qu-B 429	20	0,7389	20	0,7389
Qu-B 432	20	0,7389	20	0,7389
Qu-B 433	40	0,6171	40	0,6547
Qu-B 435	40	0,6171	40	0,6171
Qu-B 437	30	0,6744	30	0,6744

Cuadro 3b. Porcentajes y Probabilidad de mortalidad y esporulación de acuerdo a test de χ^2 para huevos de *T. absoluta* inoculados con diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana*.

Aislamiento	Mortalidad (%)	Probabilidad de mortalidad	Esporulación (%)	Probabilidad de esporulación
Qu-B 438	30	0,6744	30	0,6985
Qu-B 439	30	0,6744	30	0,6744
Qu-B 440	40	0,6171	40	0,6171
Qu-B 441	30	0,6744	30	0,6744
Qu-B 444	40	0,6171	40	0,6171
Qu-B 446	50	0,5637	50	0,5637
Qu-B 679	30	0,6744	30	0,6744
Qu-B 768	20	0,7389	0	0,9994
Qu-B 771	0	0,9994	0	0,9994
Qu-B 774	20	0,7389	0	0,9994
Qu-B 779	40	0,6171	20	0,7389
Qu-B 787a	20	0,7389	0	0,9994
Qu-B 787b	10	0,8185	0	0,9994
Qu-B 794a	10	0,8185	0	0,9994
Qu-B 796	20	0,7389	10	0,8185
Qu-B 802	30	0,6744	0	0,9994
Qu-B 857	0	0,9994	0	0,9994
Qu-B 890a	20	0,7389	0	0,9994
Qu-B 902	40	0,6171	40	0,6171
Qu-B 911	60	0,5127	60	0,5127
Qu-B 912	60	0,5127	60	0,5127
Qu-B 916	0	0,9994	0	0,9994
Qu-B 920	10	0,8185	10	0,8185
Qu-B 927	30	0,6744	20	0,7389
Qu-B 928	60	0,5127	60	0,5127
Qu-B 1026	40	0,6171	0	0,9994
Qu-B 1030	40	0,6171	0	0,9994
Qu-B 1033	30	0,6744	0	0,9994
Qu-B 1036	20	0,7389	0	0,9994
Qu-B 1038	0	0,9994	0	0,9994
Qu-B 1054	20	0,7389	0	0,9994
Qu-B 1060	60	0,5127	0	0,9994
Qu-B 1063	30	0,6744	0	0,9994
Qu-B 1077	30	0,6744	0	0,9994
Qu-B 1088	40	0,6171	40	0,6171

Cuadro 4a. Porcentajes y Probabilidad de mortalidad y esporulación de acuerdo a test de χ^2 para huevos de *T. absoluta* inoculados con diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana*.

Aislamiento	Mortalidad (%)	Probabilidad de mortalidad	Esporulación (%)	Probabilidad de esporulación
Qu-M 151b	50	0,5637	10	0,8185
Qu-M 155	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M 173c	30	0,6744	10	0,8185
Qu-M 185	40	0,6170	0	0,9994
Qu-M 205	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M 215	40	0,6170	0	0,9994
Qu-M 219	90	0,3657	30	0,6744
Qu-M 226	20	0,7388	0	0,9994
Qu-M 228	40	0,6170	10	0,8185
Qu-M 233a	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M234	20	0,7388	0	0,9994
Qu-M 239	10	0,8185	0	0,9994
Qu-M 253	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M 259	20	0,7388	0	0,9994
Qu-M 276	30	0,6744	0	0,9994
Qu-M 280	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M 282	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M 283	30	0,6744	0	0,9994
Qu-M 285	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M 287	50	0,5637	10	0,8185
Qu-M 290	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M 292	40	0,6170	20	0,7388
Qu-M 311	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M 326	60	0,5126	10	0,8185
Qu-M 340	30	0,6744	0	0,9994
Qu-M355	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M360	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M361	20	0,7388	0	0,9994
Qu-M 371	40	0,6170	0	0,9994
Qu-M 378	80	0,4142	0	0,9994
Qu-M 385b	20	0,7388	20	0,7388
Qu-M 395a	20	0,7388	0	0,9994
Qu-M 405	0	0,9998	0	0,9994
Qu-M 409	60	0,5126	0	0,9994
Qu-M 495	90	0,3657	0	0,9994

Cuadro 4b. Porcentajes y Probabilidad de mortalidad y esporulación de acuerdo a test de χ^2 para huevos de *T. absoluta* inoculados con diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana*.

Aislamiento	Mortalidad (%)	Probabilidad de mortalidad	Esporulación (%)	Probabilidad de esporulación
Qu-M 497	50	0,5637	0	0,9994
Qu-M 499	80	0,4142	0	0,9994
Qu-M 501	50	0,5637	0	0,9994
Qu-M 504	60	0,5126	0	0,9994
Qu-M 510	70	0,4630	0	0,9994
Qu-M 511	60	0,5126	0	0,9994
Qu-M 512	60	0,5126	0	0,9994
Qu-M 513	50	0,5637	0	0,9994
Qu-M 515	60	0,5126	0	0,9994
Qu-M 517	70	0,4630	0	0,9994
Qu-M 518	70	0,4630	0	0,9994
Qu-M 532	60	0,5126	0	0,9994
Qu-M 540	60	0,5126	0	0,9994
Qu-M 543	30	0,6744	0	0,9994
Qu-M 549	40	0,6170	0	0,9994
Qu-M 551	90	0,3657	0	0,9994
Qu-M 553	60	0,5126	0	0,9994
Qu-M 554	70	0,4630	0	0,9994
Qu-M 555	40	0,6170	0	0,9994
Qu-M 558	70	0,4630	60	0,5126
Qu-M 608	10	0,8185	10	0,8185
Qu-M 626	10	0,8185	0	0,9994
Qu-M 789	40	0,6170	40	0,6170
Qu-M 793	10	0,8185	10	0,8185
Qu-M 1043	30	0,6744	20	0,7388
Qu-M 1080	50	0,5637	20	0,7388

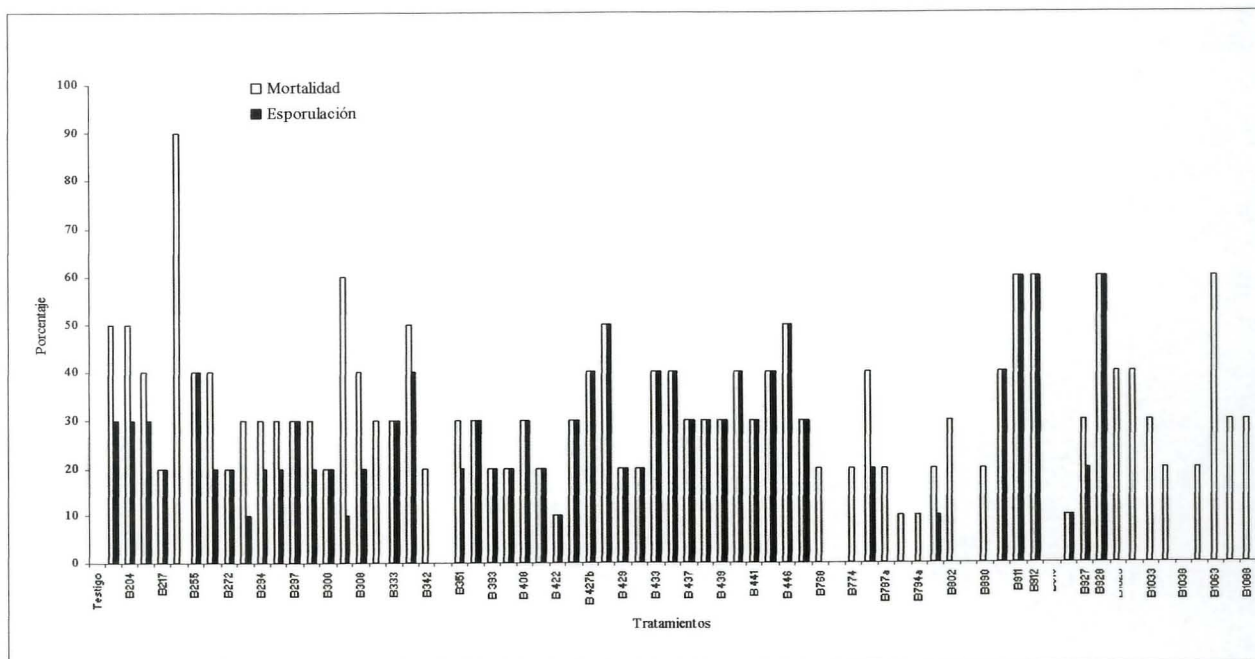


Figura 3b: Mortalidad y esporulación sobre huevos de *T. absoluta*, inoculados con distintas aislaciones de *Beauveria bassiana*.

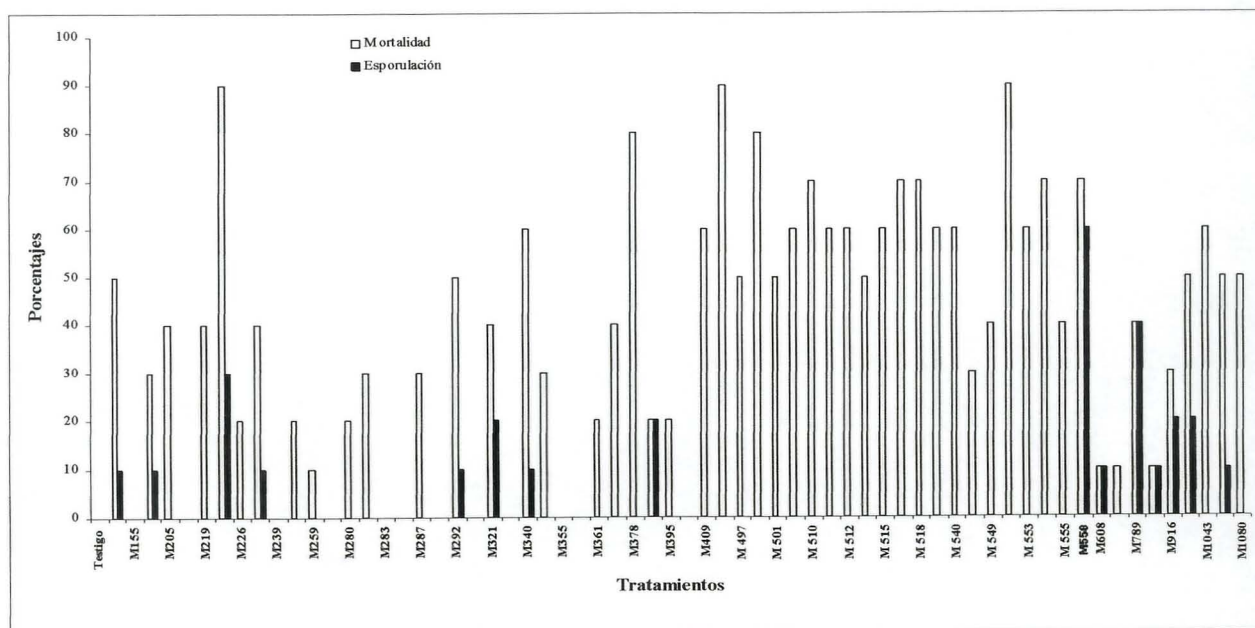


Figura 3c: Mortalidad y esporulación sobre huevos de *T. absoluta*, inoculados con distintas aislaciones de *Metarhizium anisopliae*.

Dado los resultados anteriores se preseleccionaron los aislamientos Qu-M558, Qu-B911, Qu-B912 y Qu-B928 como los más promisorios para el control de huevos de la polilla.

Al evaluar nuevamente los aislamientos Qu-M558, Qu-B911, Qu-B912 y Qu-B928 a diferentes dosis de inóculo se pudo observar que los mayores porcentajes de mortalidad de huevos (77 y 60%) se observaron con la dosis de 10^8 conidias mL^{-1} (10^{14} conidias ha^{-1}) de las aislaciones Qu-M558 y Qu-B912. Al analizar el área bajo la curva de estas aislaciones, se pudo apreciar que no existen diferencias entre ellas, pero si con respecto a las aislaciones Qu-B911 y Qu-B928 las que produjeron bajos porcentajes de mortalidad de huevos (Figuras 4a, 4b y 5).

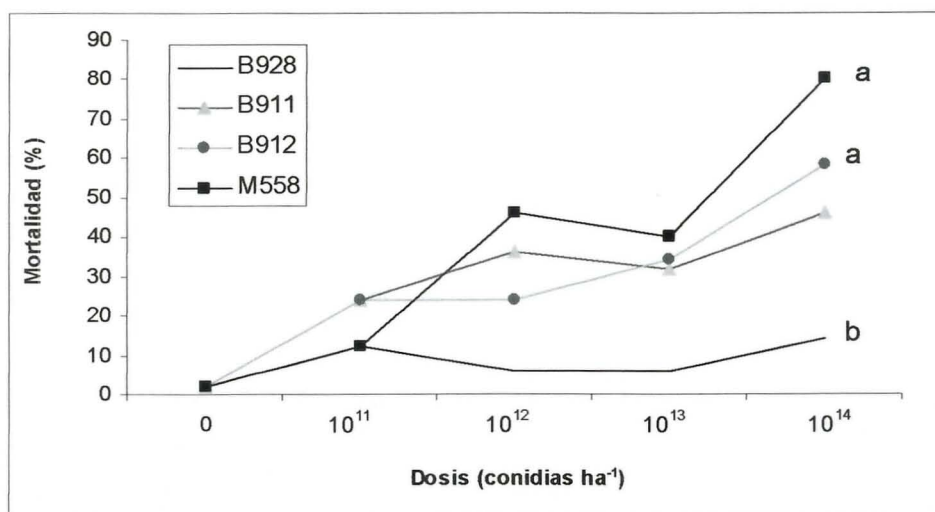


Figura 4a: Mortalidad de huevos con diferentes dosis de las aislaciones Qu-M558, Qu-B911, Qu-B912 y Qu-B928.

Letras iguales indican que no existe diferencias significativas entre tratamientos según test de Duncan ($P \leq 0.05$).

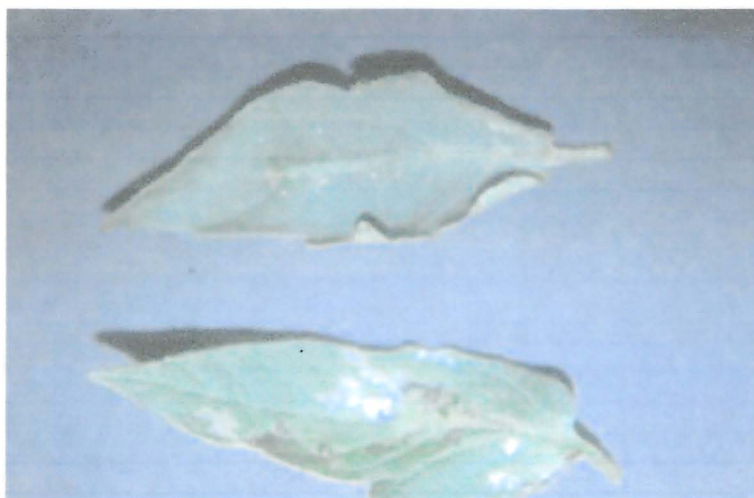


Figura 4b: Hoja con 10 huevos de polilla del tomate tratada con la Aislación Qu-M558 (arriba) y hoja testigo sin tratamiento (abajo), 10 días después de iniciado el ensayo.

Las diferencias mencionadas anteriormente están marcadas también, por la capacidad de las aislaciones: Qu-M558 y Qu-B912 de producir micelio y esporas sobre los huevos, transformándose en una característica deseable para favorecer la propagación de la enfermedad en terreno y en la masificación comercial (Figura 5).



Figura 5: Huevo de *T. absoluta*, sano (izq.) y parasitado (der.) por hongos entomopatógenos.

Dado los resultados obtenidos, se seleccionaron las aislaciones Qu-M558 y Qu-B912 como las más agresivas para el control de la polilla y con las cuales se realizaron los estudios de dosis y tiempo letal.

ACTIVIDAD 5. Pruebas con insectos benéficos

1. Evaluación de los aislamientos sobre *Trichogramma nerudai*

1.a Emergencia y parasitismo de *T. nerudai* emergidos desde huevos de *Sitotroga* inoculados con HEP.

No se observaron diferencias en cuanto a emergencia de *T. nerudai* y parasitación de nuevos huevos entre el testigo y los aislamientos evaluados (Figuras 6a y 6b).

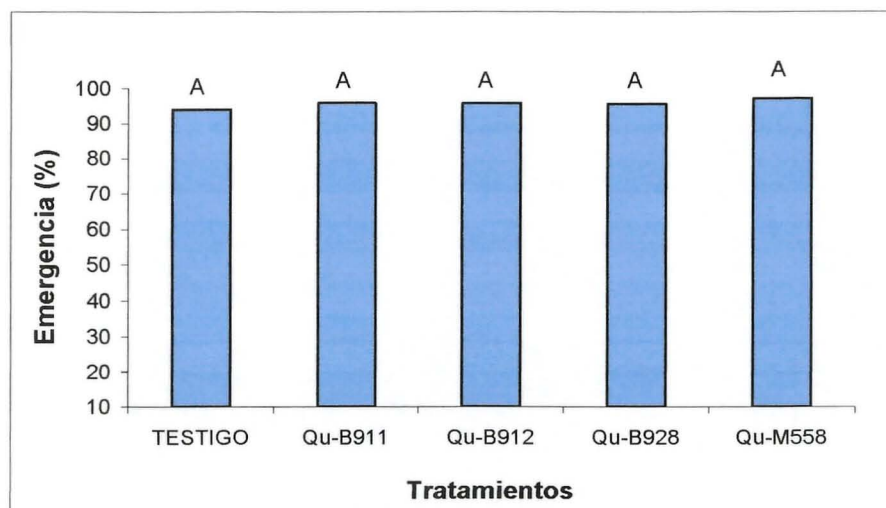


Figura 6a: Emergencia de *Trichogramma nerudai* en huevos recién parasitados, inoculados con distintos aislamientos seleccionados para el control de *T. absoluta*.

Barras con letras iguales indican que no hubo diferencias estadísticas según prueba de Fisher ($P=0.779$).

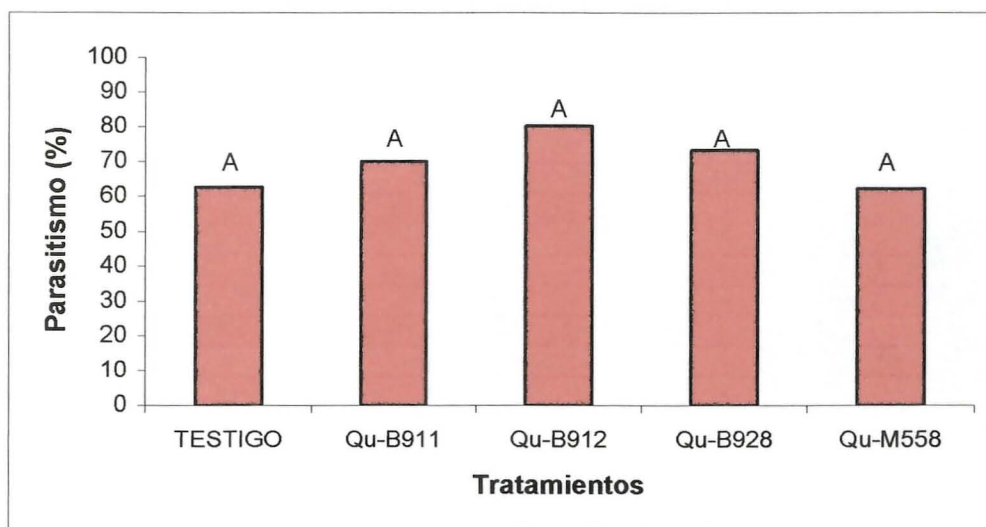


Figura 6b: Parasitismo de *Trichogramma nerudai* emergidos desde huevos inoculados con los aislamientos seleccionados para el control de *T. absoluta*, sobre huevos de *Sitotroga cerealella*.

Barras con letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas según prueba de Fisher ($P=0.083$).

Lo anterior implica que ninguno de los aislamientos causó una disminución en la emergencia de *Trichogramma* tanto en huevos recién parasitados como en los que estaban por emerger. Tampoco se observó un efecto en la capacidad de parasitar nuevos huevos, en los *Trichogramma* recién emergidos (Figuras 7a y 7b).

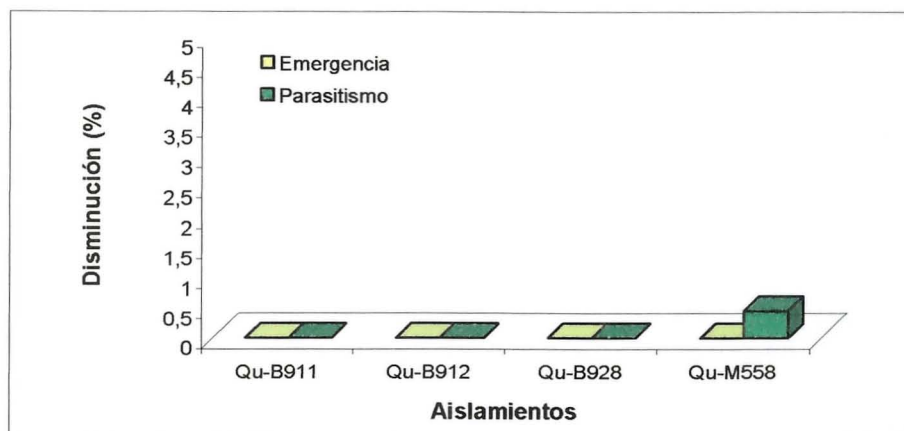


Figura 7a: Efecto de la aplicación de los aislamientos seleccionados en huevos a punto de emerger, sobre la emergencia y parasitismo de *Trichogramma nerudai*.

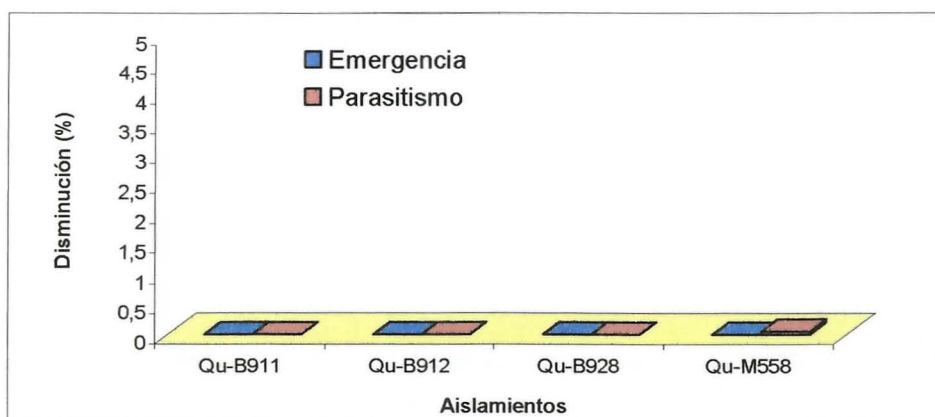


Figura 7b: Efecto sobre la emergencia y parasitismo de *Trichogramma nerudai* por la aplicación de HEP en huevos recién parasitados.

De los aislamientos evaluados Qu-B912 y Qu-M558, inoculados sobre adultos del parasitoide, ninguno causó una disminución en la capacidad de parasitar huevos. Tampoco se afectó la capacidad de parasitar nuevos huevos en *Trichogramma* recién emergidos no observándose diferencias estadísticas entre los tratamientos ni con respecto al testigo (Figura 7a). Lo anterior demuestra la inocuidad de los aislamientos Qu-B912 y Qu-M558 sobre *Trichogramma nerudai*.

1.b Susceptibilidad de adultos de *Trichogramma* a los hongos.

Los resultados obtenidos en esta prueba indican que no hubo efecto de los hongos en la viabilidad de adultos y en la capacidad de estos de parasitar nuevos huevos de la polilla de los cereales (*S. cerealella*) (Figura 8).

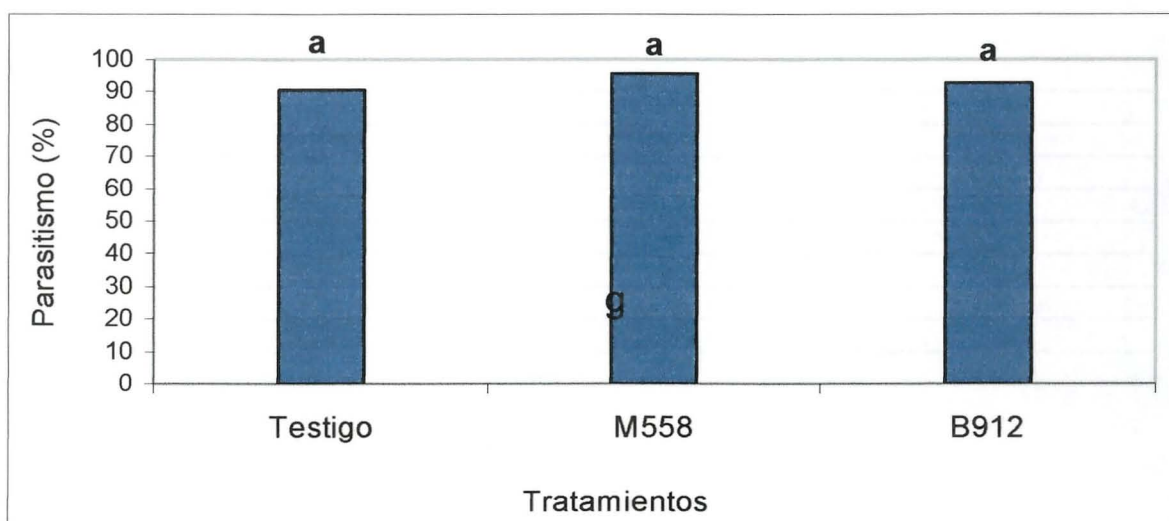


Figura 8: Parasitismo de adultos *Trichogramma nerudai* inoculados con HEP para el control de *T. absoluta*, sobre huevos de *Sitotroga cerealella*.

Barras con letras iguales indican que no hay diferencia estadística según prueba de Fischer ($P=0.083$)

2. Evaluación de los aislamientos sobre *Encarsia formosa*.

2.a Parasitismo de *E. formosa* sobre ninfas de *T. vaporariorum* inoculadas con Qu-M558 y Qu-B912.

La presencia de inóculo de los aislamientos Qu-M558 y Qu-B912 sobre las ninfas no parasitadas de *T. vaporariorum*, no afectaron el atractivo parasítico de *E. formosa* sobre estas, siendo efectivamente utilizadas como sustrato para la oviposición de huevos de *Encarsia*.

Esto descarta la posible influencia negativa que ejerce la presencia de hongos entomopatógenos sobre los hospederos de los parasitoides, ya que algunas especies de ellos son capaces de discriminar hospederos infectados (Alves, 1998; Pell y Roy, 2002).

Al cabo de 12 días de iniciada la parasitación de las ninfas, se produjo la totalidad de emergencia de adultos de *Encarsia*, alcanzando para los dos tratamientos con hongos y el testigo porcentajes de parasitismo y emergencia del orden del 90% de las ninfas inoculadas, no observando diferencias entre ellos (Figura 9).

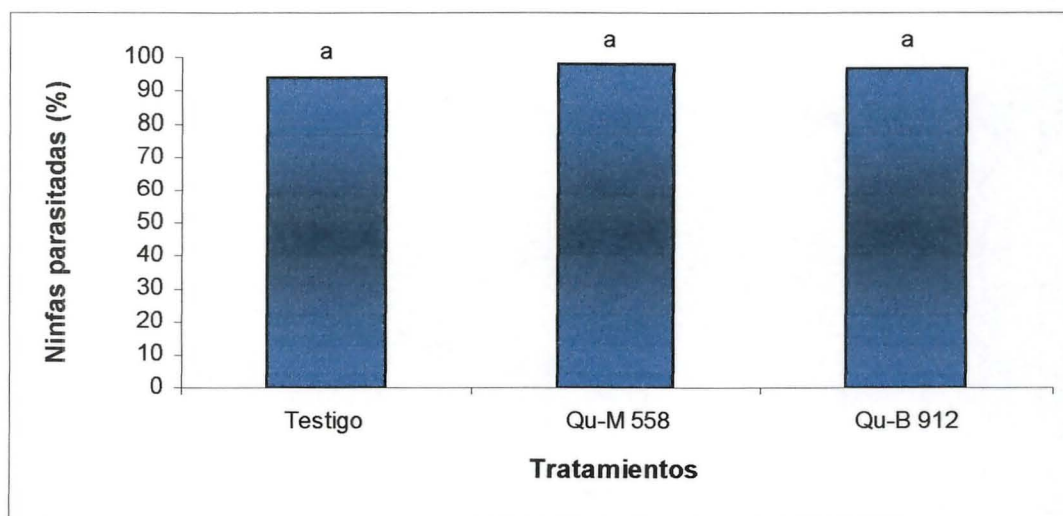


Figura 9. Parasitismo de *Encarsia formosa* sobre ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* inoculadas con los aislamientos Qu-M558 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y Qu-B912 de *Beauveria bassiana*.

Letras iguales indican que no hubo diferencias estadísticas $P=0,085$

2.b Capacidad parasítica de adultos de *E. formosa* inoculados con Qu-M558 y Qu-B912.

Los aislamientos Qu-M558 y Qu-B912 no afectaron la viabilidad y capacidad parasíticas de adultos de *E. formosa*. Tal como se muestra en la (Figura 10), no hubo diferencias entre los tratamientos y el testigo, los que alcanzaron un nivel de parasitismo cercano al 100%. Tampoco se detectó mortalidad de adultos lo que asegura una selectividad y especificidad de parasitismo hacia *T. absoluta* de los aislamientos utilizados.

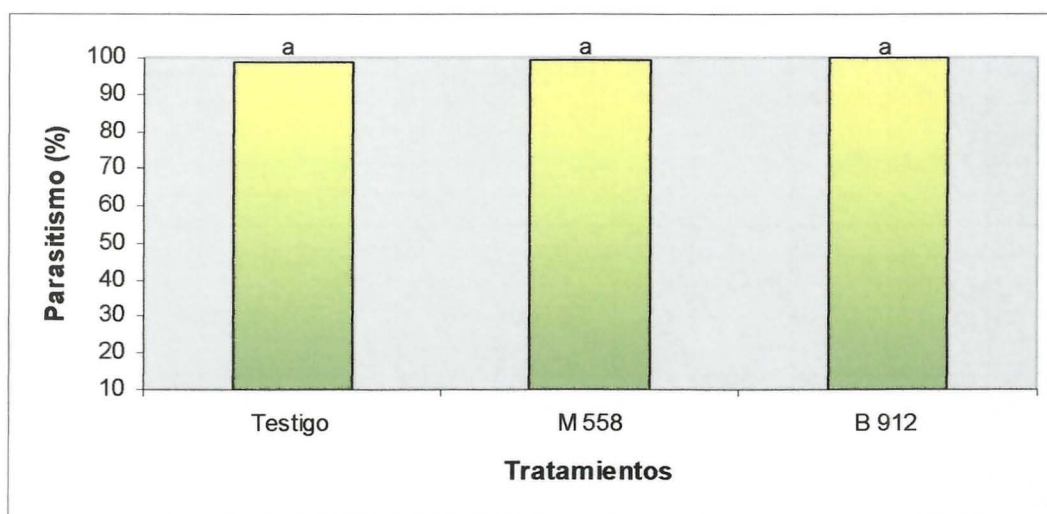


Figura 10. Parasitismo de *Encarsia formosa* inoculados con los aislamientos Qu-M558 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y Qu-B912 de *Beauveria bassiana* sobre ninfas de *Trialeurodes vaporariorum*.

Letras iguales indican que no hubo diferencias estadísticas $P=0,085$

Cabe señalar además que a pesar de las condiciones ambientales óptimas en que se realizó el ensayo (alta humedad y temperatura) para el desarrollo patológico de los aislamientos sobre *E. formosa* no se produjo infección ni inhibición en la capacidad predadora de los adultos inoculados, permitiendo inferir que en condiciones de campo puede existir una interacción positiva entre los parasitoides y los aislamientos utilizados.

2.c Emergencia de *E. formosa* desde ninfas parasitadas de *T. vaporariorum* inoculadas con Qu-M 558 y Qu-B 912.

Emergencia cercana al 100% de adultos desde ninfas parasitadas e inoculadas con HEP, se observaron en los tres tratamientos, no existiendo diferencias entre ellos (Figura 11).

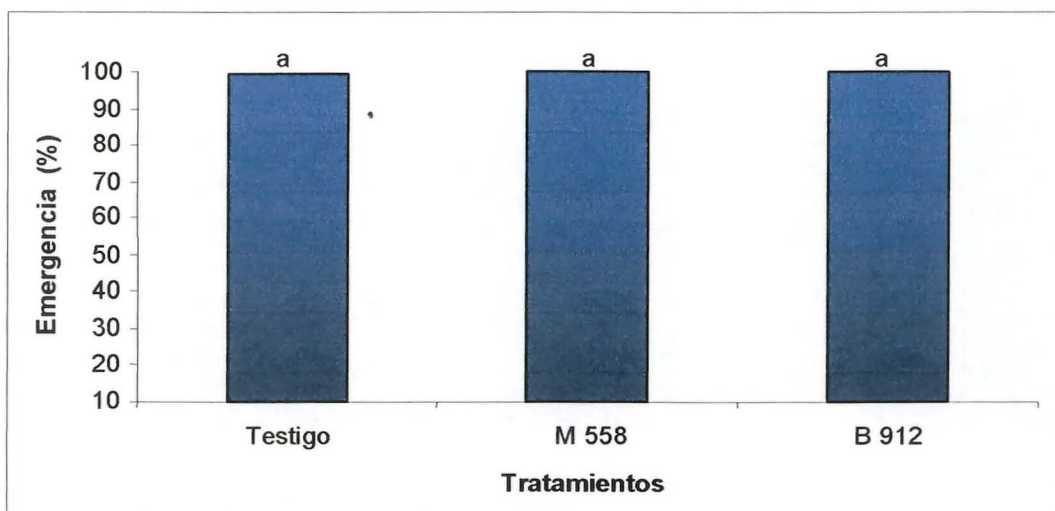


Figura 11. Emergencia de *Encarsia formosa* desde ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* parasitadas e inoculadas con los aislamientos Qu-M558 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y Qu-B912 de *Beauveria bassiana*.

Letras iguales indican que no hubo diferencias estadísticas $P=0,083$

Lo anterior demuestra una vez más la inocuidad de los aislamientos Qu-B912 y Qu-M558 sobre *Encarsia formosa* y su actividad parasítica.

3. Evaluación de los aislamientos sobre *Apis mellifera*.

3.a Parasitismo de *A. mellifera* a través de inoculaciones de HEP en flores.

La condición de confinamiento en la que permanecieron las colmenas produjo una gran desorganización y con ello la muerte de algunas obreras. Sin embargo, al incubarlas no se observó parasitismo por hongo lo que descartó la posibilidad de ataque de estos organismos hacia las abejas.

3.b Parasitismo sobre *A. mellifera* con inoculaciones de HEP en la colmena.

Desde la inoculación de las colmenas con los aislamientos Qu-M558 y Qu-B912 no se observó inhibición en el crecimiento. A medida que avanzó la temporada éstas aumentaron normalmente su número de crías y obreras además del alimento, llegando a los 10 marcos trabajados en todos los tratamientos, debiendo colocar alza a las 3 semanas de iniciado el ensayo. Tampoco se observó daño por otros parásitos o insectos oportunistas de alguna deficiencia sanitaria de la colmena. De acuerdo al test de Chi cuadrado no se observó diferencias en el crecimiento de las colmenas tratadas y no tratadas con hongo ($P= 0,98$) permitiendo inferir que estos aislamientos son inocuos a *Apis mellifera* (Figura 12).

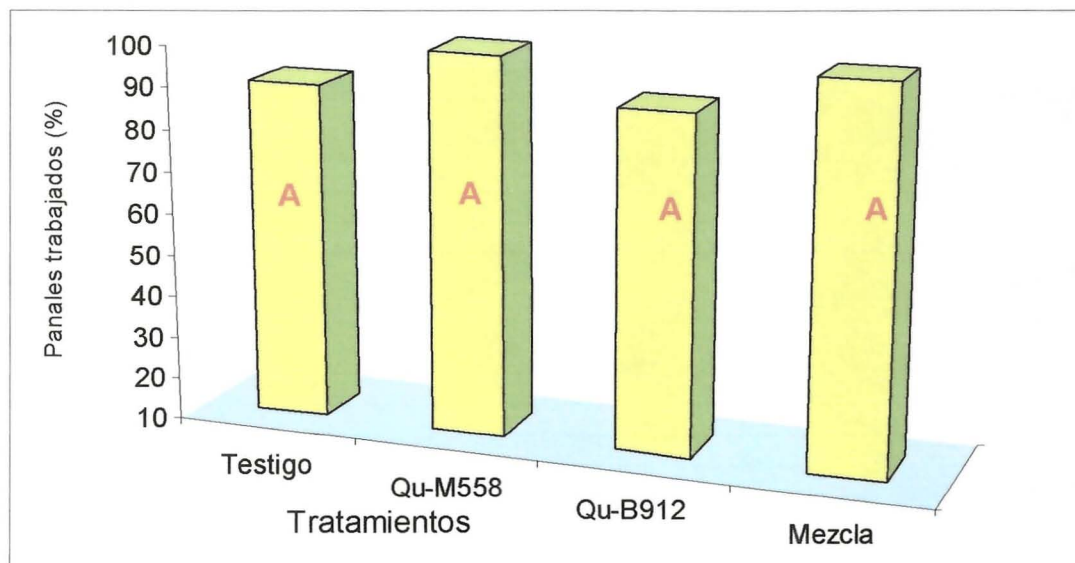


Figura 12: Efecto de los aislamientos Qu-M558 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y Qu-B912 de *Beauveria bassian* sobre el crecimiento de colmenas tratadas.

4. Evaluación de los aislamientos sobre *Bombus terrestris*.

4.a Parasitismo de *B. terrestris* a través de inoculaciones de HEP en flores.

Se observó un normal desarrollo de la actividad polinizadora de estos insectos constatando además, la ausencia de cadáveres en el invernadero y en lugares cercanos a la piquera. Lo anterior permite concluir que la aplicación de HEP, sobre las plantas para evitar daño por polilla del tomate, no afecta la viabilidad de la colmena de *B. terrestris* ni su actividad polinizadora.

ACTIVIDAD 6. Pruebas de dosis y tiempo letal.

Para ambos aislamientos se observó una correlación positiva entre la concentración de conidias y la muerte tanto de huevos, como de larvas de *T. absoluta*.

La comparación de los dos aislamientos a diferentes dosis se realizó a partir del día 12 post-inoculación, que correspondió al día en que alguno de los aislamientos logró el 80% de mortalidad de huevos y a partir del día 9 post-inoculación en el cual se produjo el 90% de mortalidad de larvas.

Ambos aislamientos lograron una mortalidad de larvas por sobre el 90% a una dosis de 10^8 conidias mL^{-1} .

A una dosis de 10^7 conidias mL^{-1} , la aislación Qu-B912 logró el mayor porcentaje de mortalidad de larvas (86%), superando en un 14% a la mortalidad alcanzada por la aislación Qu-M558 (Figura 13a y 13b).

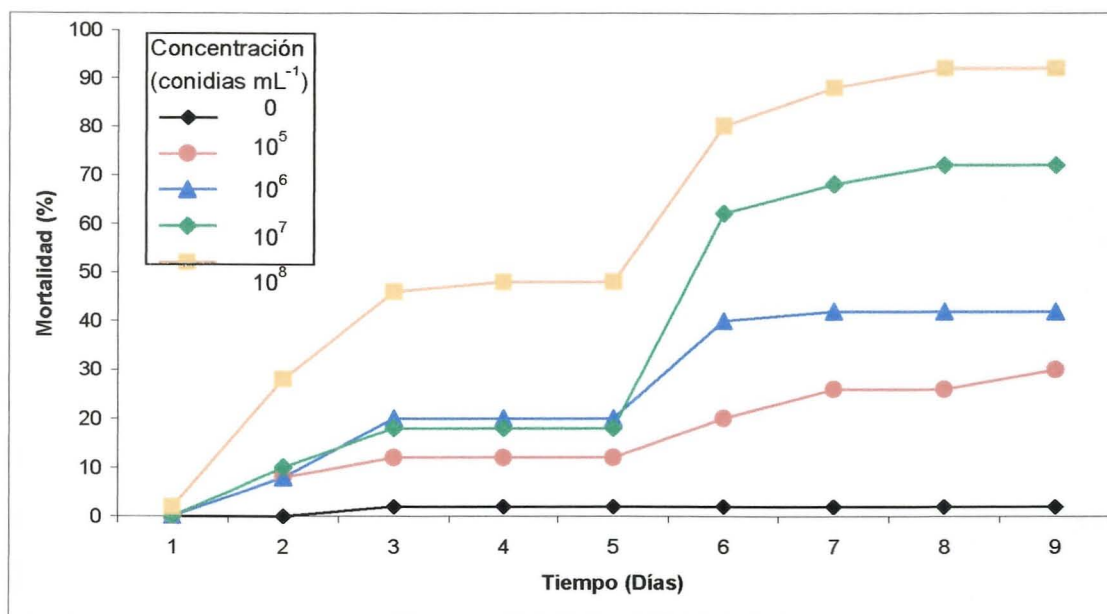


Figura 13a: Mortalidad diaria de larvas de *Tuta absoluta*, inoculadas con distintas dosis de *Metarhizium anisopliae*, aislación Qu-M558.

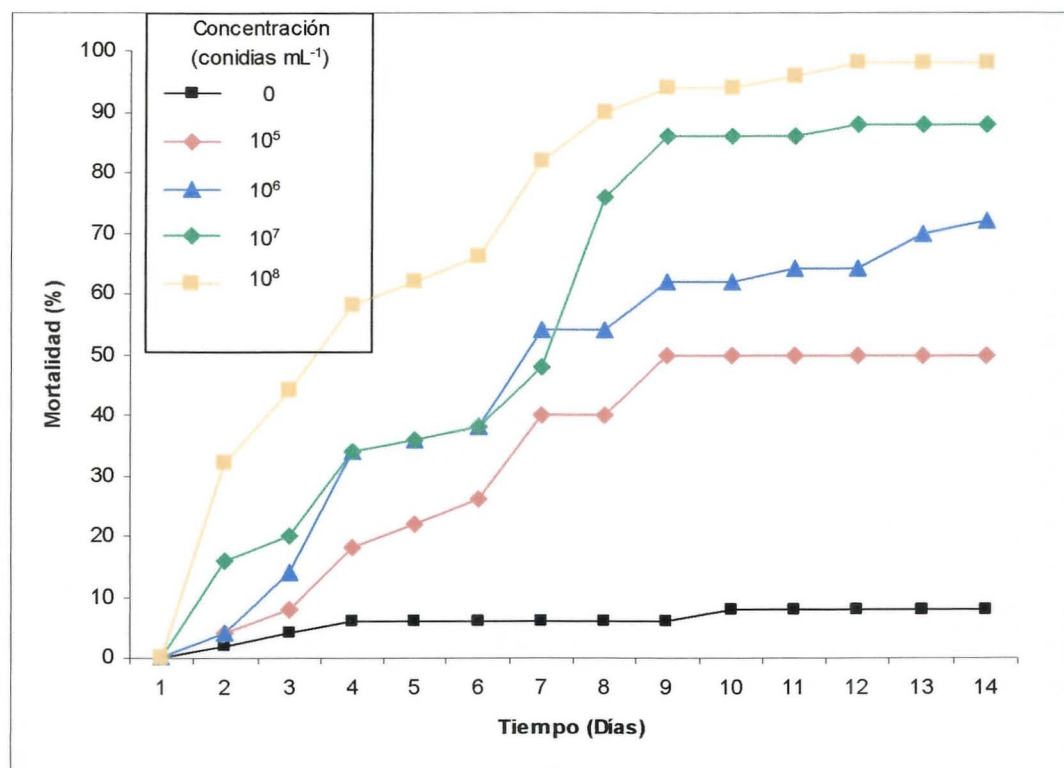


Figura 13b: Mortalidad diaria de larvas de *Tuta absoluta*, inoculadas con distintas dosis de *Beauveria bassiana*, aislación Qu-B912.

Al comparar el área bajo la curva de mortalidad vs dosis de ambos aislamientos no se observaron diferencias estadísticas lo que indica que ambos aislamientos son efectivos para el control de larvas (Cuadro 5).

Cuadro 5: Área bajo la curva de mortalidad de larvas de *Tuta absoluta* al día 9 de inoculadas con distintas concentraciones de los aislamientos Qu-M558 y Qu-B912.

Tratamiento	Área bajo la curva
Qu- M558	255 ns
Qu- B912	360

ns: no hubo diferencias significativas (P. Duncan $\leq 0,05$)

La curva de mortalidad de larvas con ambas aislaciones se ajustó a una sigmoidea y luego de la transformación Probit se obtuvo la ecuación de la recta para cada aislación (Figuras 14a y 14b).

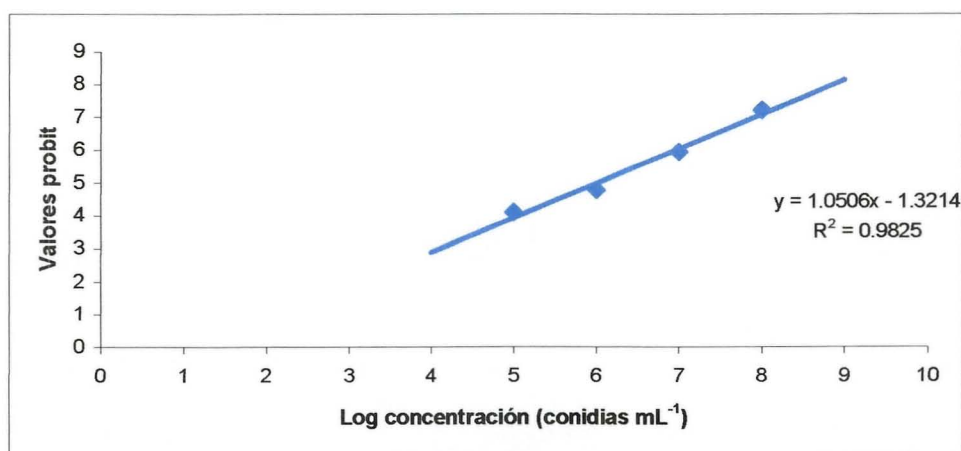


Figura 14a: Regresión Probit para la curva de mortalidad de larvas de *T. absoluta* inoculadas con distintas concentraciones Qu-B221.

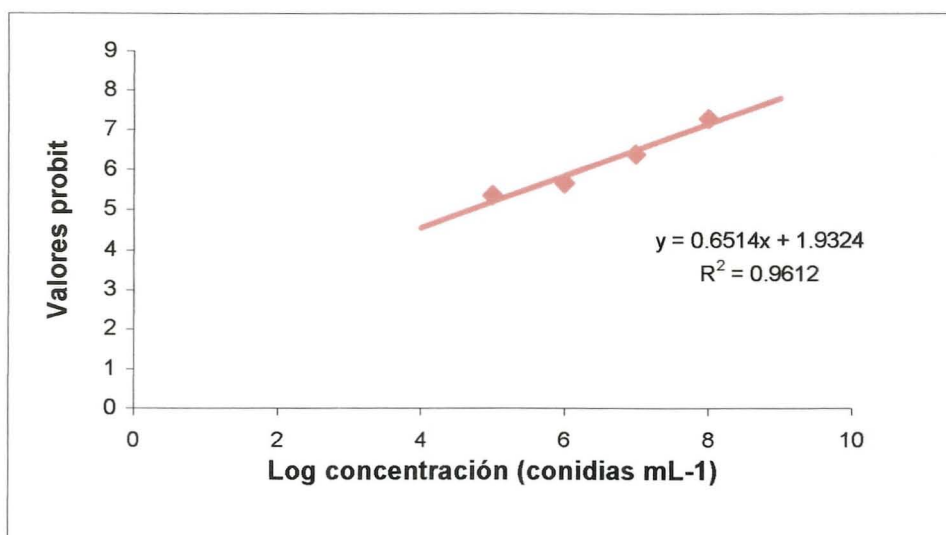


Figura 14b: Regresión Probit para la curva de mortalidad de larvas de *T. absoluta* inoculadas con distintas concentraciones Qu-M558.

Los valores estimados de CL50 y CL90 fueron de $10^{4.7}$ y $10^{6.7}$ conidias/ml para la aislación Qu-B912 y de 10^6 y $10^{7.2}$ conidias/ml para Qu-M558. Estos valores equivalen a $4,4 \times 10^{10}$ y $4,4 \times 10^{12}$ conidias/ha de la aislación Qu-B912 y $8,85 \times 10^{11}$ y $1,4 \times 10^{13}$ conidias/ha de la aislación Qu-M558.

Si bien ambas aislaciones fueron efectivas para el control de larvas de *T. absoluta* es importante considerar que para lograr un mismo porcentaje de mortalidad se necesitaron 10 veces más conidias de Qu-M558 que de Qu-B912 (Figuras 14 a y b). Los tiempos letales para lograr el 50 y 90% de mortalidad de larvas con diferentes dosis de cada aislación se presentan en el siguiente cuadro (Cuadro 6).

Cuadro 6: Tiempos letales para las distintas concentraciones (conidias mL⁻¹) de las aislaciones Qu-M558 y Qu-B912.

Aislación	Mortalidad (%)	Tiempo (días)			
		Log concentración (conidias mL ⁻¹)			
		5	6	7	8
Qu-M558	50	8.1	8.1	6.4	4.5
	90	12	12.6	9.6	7.8
Qu-B912	50	8.1	7	6.2	4.8
	90	12.07	10.56	9.5	7.7

La curva de mortalidad de huevos con diferentes dosis de ambas aislaciones también se ajustó a una sigmoidea, obteniendo la ecuación de la recta después de la transformación Probit (Figuras 15a y 15b).

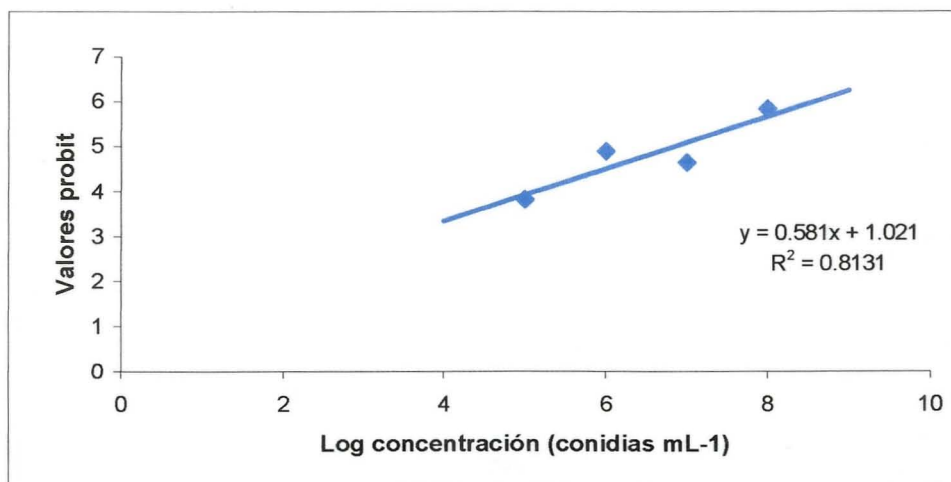


Figura 15a: Regresión Probit para la curva de mortalidad de huevos de *T. absoluta* inoculados con distintas concentraciones de la aislación Qu-M558.

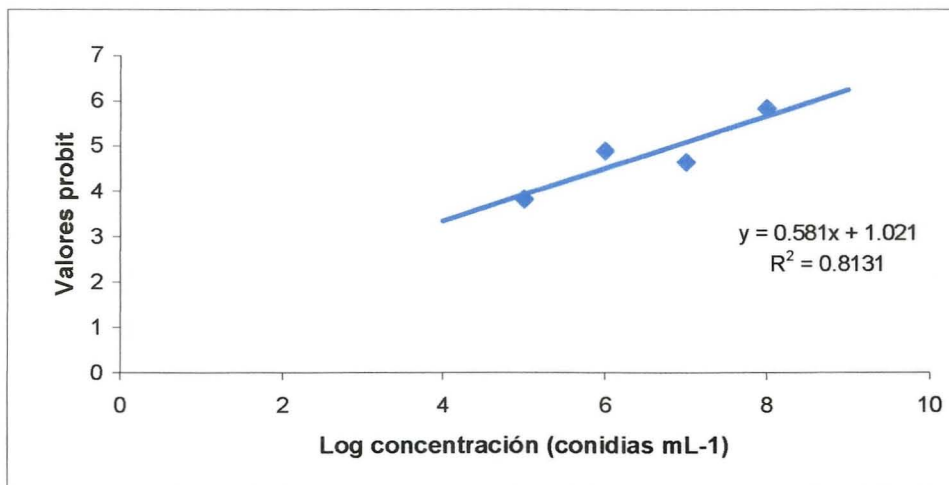


Figura 15b: Regresión Probit para la curva de mortalidad de huevos de *T. absoluta* inoculados con distintas concentraciones de la aislación Qu-B912.

Al obtener las concentraciones letales para producir el 50 y 90% de mortalidad de huevos con cada aislación, se pudo observar una situación inversa a la ocurrida con las larvas, ya que las CL50 y CL90 de Qu-M558 ($10^{6.8}$ y 10^9 conidias/mL) fueron menores que las CL50 y CL90 de Qu-B912 ($10^{7.8}$ y 10^{11} conidias/mL).

Estas diferencias en cuanto a las CL50 y CL90 para huevos y larvas, de ambas aislaciones, indican que es recomendable utilizarlas juntas de manera que puedan complementar su patogenicidad ya que Qu-B912 fue más patógeno sobre larvas que sobre huevos.

ACTIVIDAD 7. Elaboración de una formulación de biopesticida resistente a la desecación.

Las esporas del aislamiento Qu-B912 presentaron una buena resistencia a la deshidratación logrando tasas de germinación por sobre el 90% a diferentes niveles de humedad de conservación, no observando con ello diferencias entre tratamientos (Figura 16a).

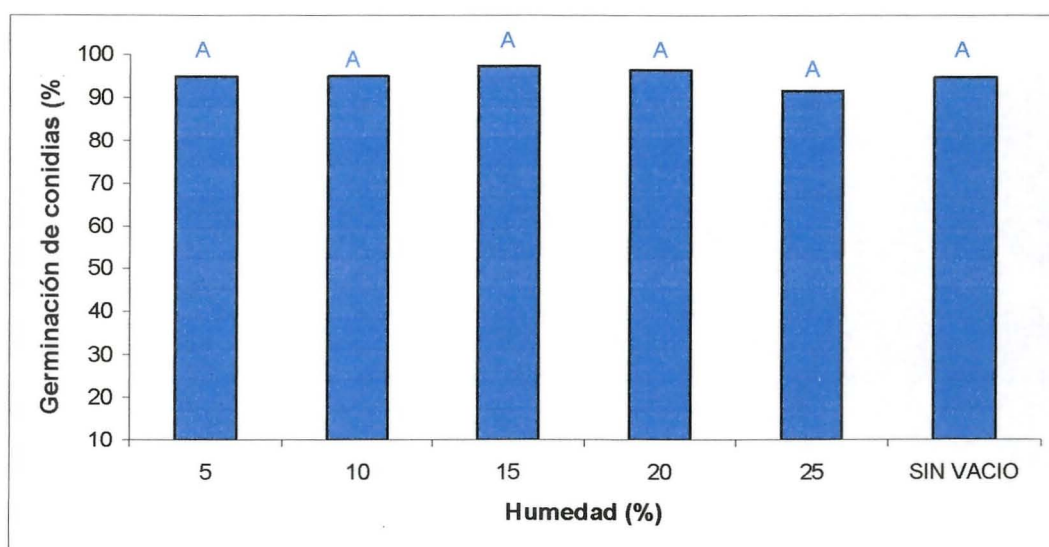


Figura 16a: Germinación de conidias *Beauveria bassiana* aislación Qu-B912, con diferentes porcentajes de humedad.

Barras con letras iguales indican que no hubo diferencias entre tratamientos según test de Duncan $P \leq 0.05$

Estos resultados nos permiten inferir que la formulación de conidias puras de la aislación Qu-B912 con diferentes contenidos de humedad no afecta su viabilidad por lo que no se hace necesario realizar pruebas con otros tipos de formulación.

Para la aislación Qu-M558 no se observó diferencias en la germinación de conidias que contenían 5, 10, 15 y 20% de humedad al vacío y las almacenadas sin vacío, todas las cuales alcanzaron tasas de germinación entre el 75 y 90%.

Sin embargo, si se apreciaron diferencias entre estos tratamientos y las conidias almacenadas con un 25% de humedad las que produjeron el menor porcentaje de germinación (63%), todas mantenidas en vacío (Figura 16b).

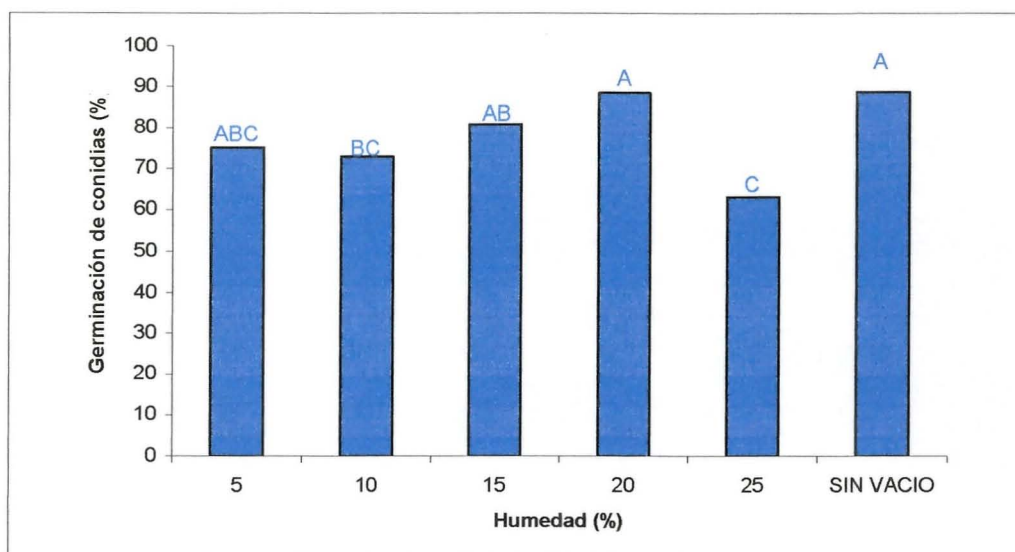


Figura 16b: Germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* aislación Qu-M558, con diferentes porcentajes de humedad.

Barras con letras iguales indican que no hubo diferencias entre tratamientos según test de Duncan ($P \leq 0.05$).

Estas diferencias en germinación indican que la hidratación excesiva de las conidias de la aislación Qu-M558, puede afectar su viabilidad durante el almacenamiento, recomendando entonces almacenarlas con un contenido de humedad menor o igual al 20%.

Al evaluar la germinación del producto después de un periodo de almacenamiento de 6 meses, se pudo comprobar que los niveles de germinación variaron entre las especies de HEP, siendo la aislación Qu-B912 de *Beauveria bassiana* la más resistente a las condiciones de almacenamiento (Figura 17a, 17b y 18a, 18b).



Los mayores porcentajes de germinación de las conidias se obtuvieron cuando estas estuvieron almacenadas a 5°C, sin observar influencia de los contenidos de humedad. Esto permitió comprobar que las temperaturas de almacenaje son un factor importante para la conservación de la viabilidad de las esporas, recomendándose entonces temperaturas de almacenamiento no mayores a esta.

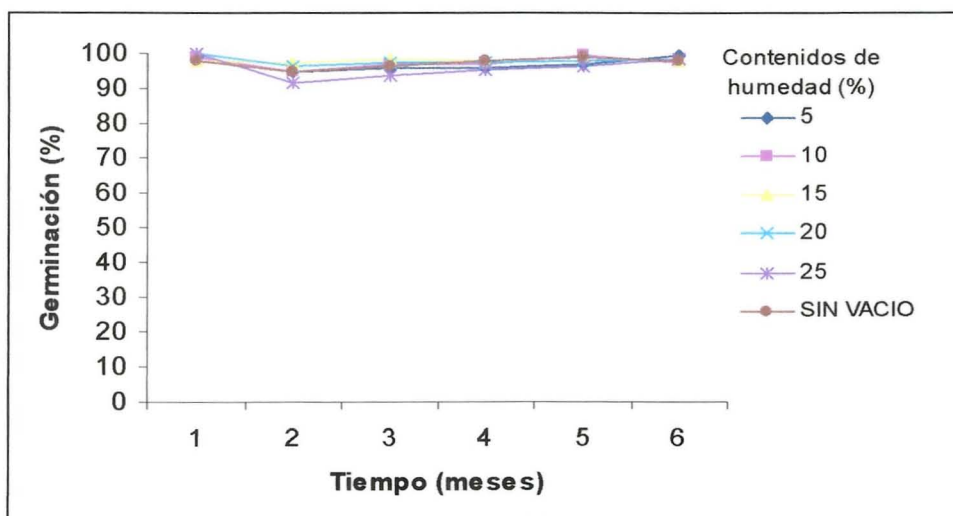


Figura 17a: Germinación de conidias del aislamiento Qu-B912 a través del tiempo, almacenadas a 5°C.

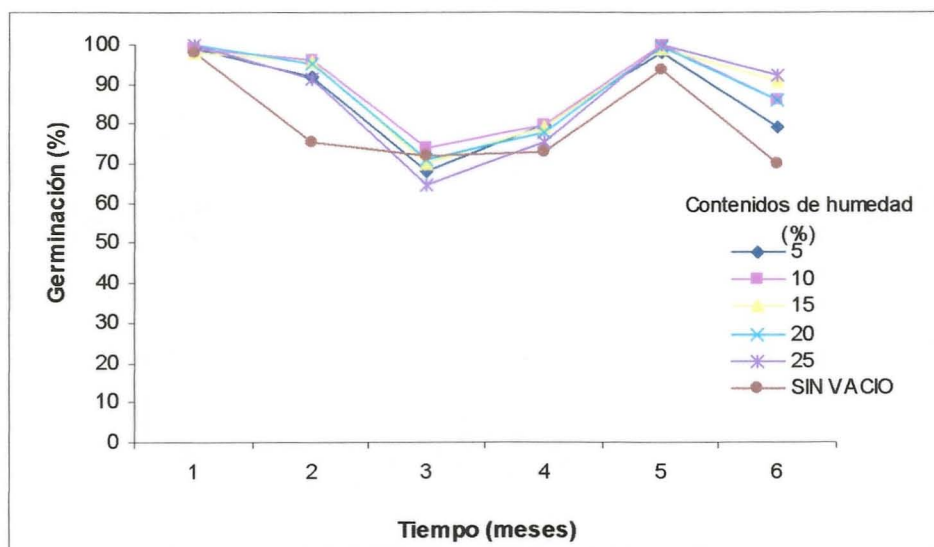


Figura 17b: Germinación de conidias del aislamiento Qu-B912 a través del tiempo, almacenadas a 20°C.

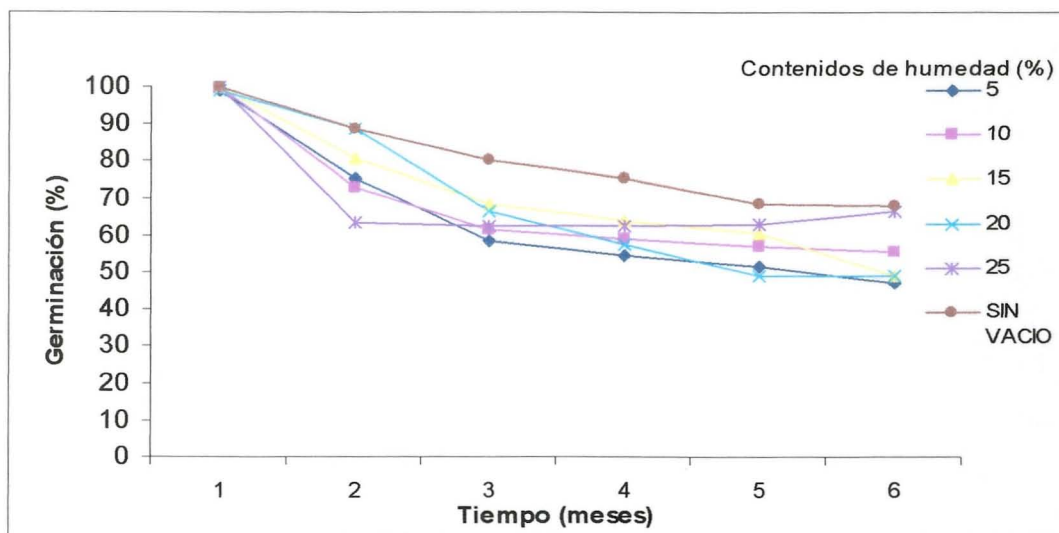


Figura 18a: Germinación de conidias del aislamiento Qu-M558 a través del tiempo, almacenadas a 5°C.

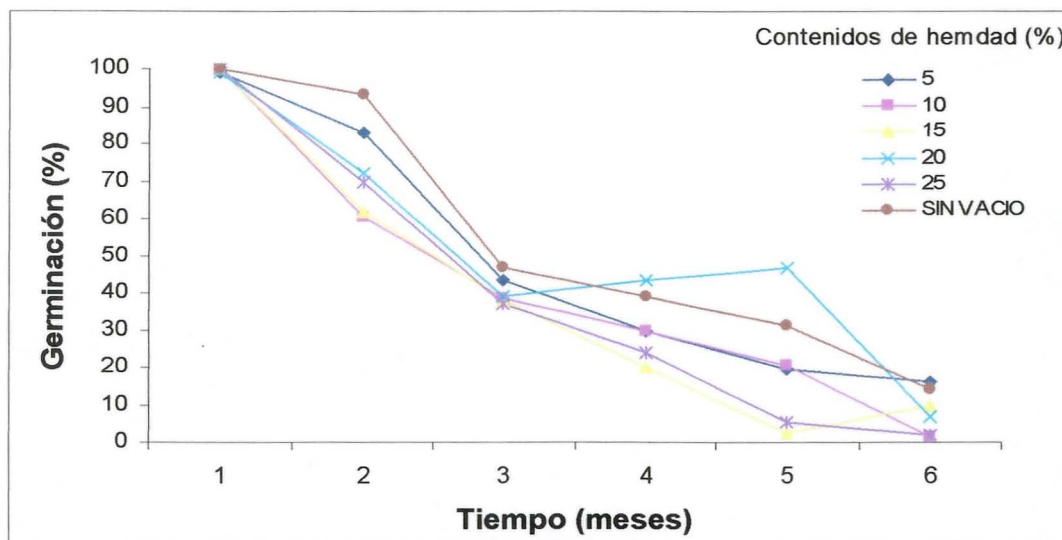


Figura 18b: Germinación de conidias del aislamiento Qu-M558 a través del tiempo, almacenadas a 20°C.

Estos resultados permiten inferir que con el almacenamiento del biopesticida a 5°C, por un periodo no mayor a 5 meses se obtendrá una viabilidad del producto entre el 80 y 60%.

ACTIVIDAD 8. Elaboración de una formulación de biopesticida resistente a la luz ultravioleta.

Las conidias de las aislaciones Qu-M558 y Qu-B912 presentaron una rápida pérdida de viabilidad al exponerlas a luz ultravioleta. Los porcentajes de germinación al agregar sustancias protectoras aumentaron considerablemente observándose diferencias entre los tratamientos con tiempos de exposición de 5 y 10 segundos (Figuras 19a y 19b).

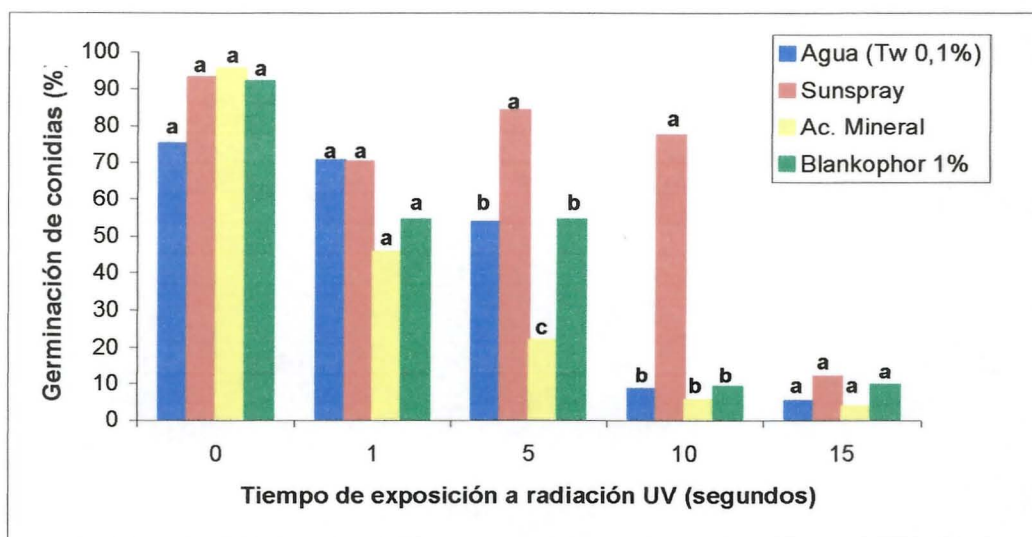


Figura 19a: Germinación de conidias de Qu-M558, expuestas en tiempos crecientes a luz ultravioleta, con distintas formulaciones.

Letras distintas entre tratamientos (formulaciones) indican diferencias estadísticas según test de Duncan ($P \leq 0,05$)

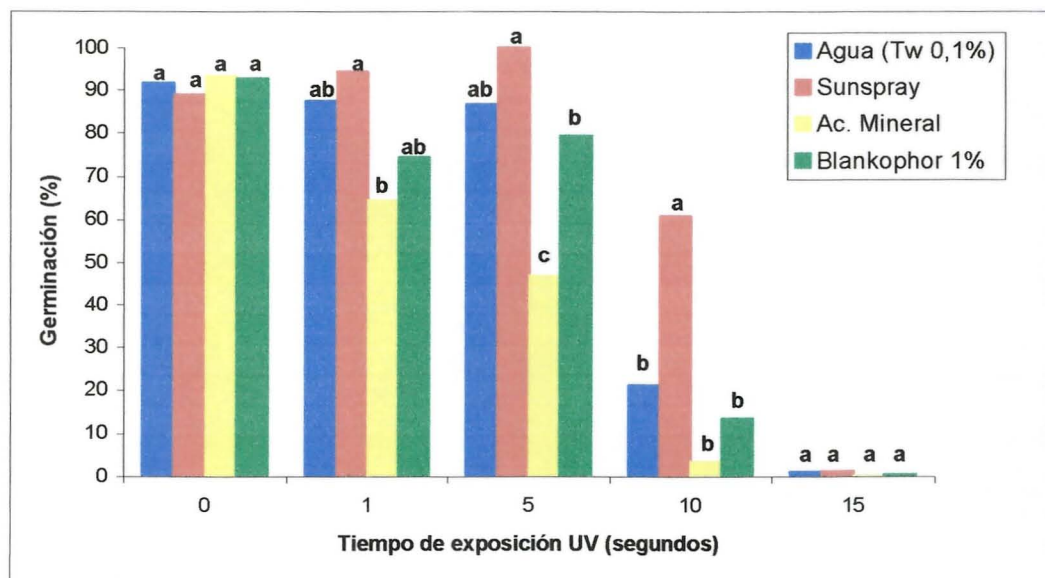


Figura 19b: Germinación de conidias de Qu-B912, expuestas en tiempos crecientes a luz ultravioleta, con distintas formulaciones.

Letras distintas entre tratamientos (formulados) indican diferencias estadísticas según test de Duncan ($P \leq 0,05$).

El mayor grado de protección de las conidias expuestas por 10 segundos a la radiación UV, fue el otorgado por el aceite mineral miscible Sun Spray (MR), el cual favoreció la germinación de sobre el 60% de ellas. Aunque la intensidad de luz utilizada es superior a la intensidad de luz natural, este ensayo nos permite seleccionar el protector más adecuado para ser utilizado en terreno.

Al comparar las formulaciones de conidias de ambas aislaciones a diferentes tiempos de exposición protegidas por plástico anti UV, se pudo observar que la UV no afectó la viabilidad de las conidias. Estas alcanzaron altos porcentajes de germinación llegando incluso al 70%, con un tiempo de exposición de 15 segundos (Figuras 20a y 20b).

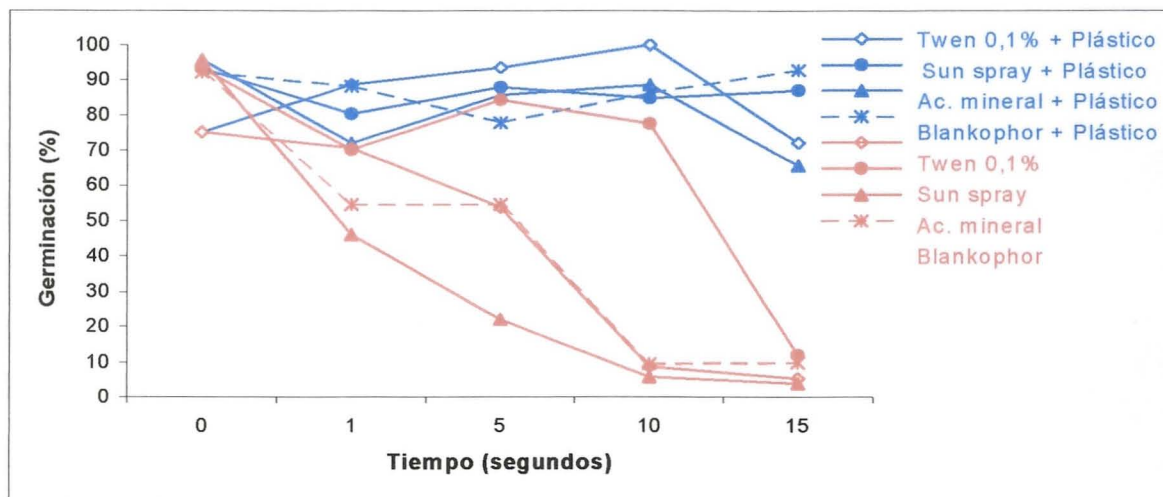


Figura 20a: Germinación de los distintos formulados de conidias de la aislación Qu-M558, expuestos en tiempos crecientes a radiación UV, con plástico anti UV (azul) y sin plástico anti UV (rojo).

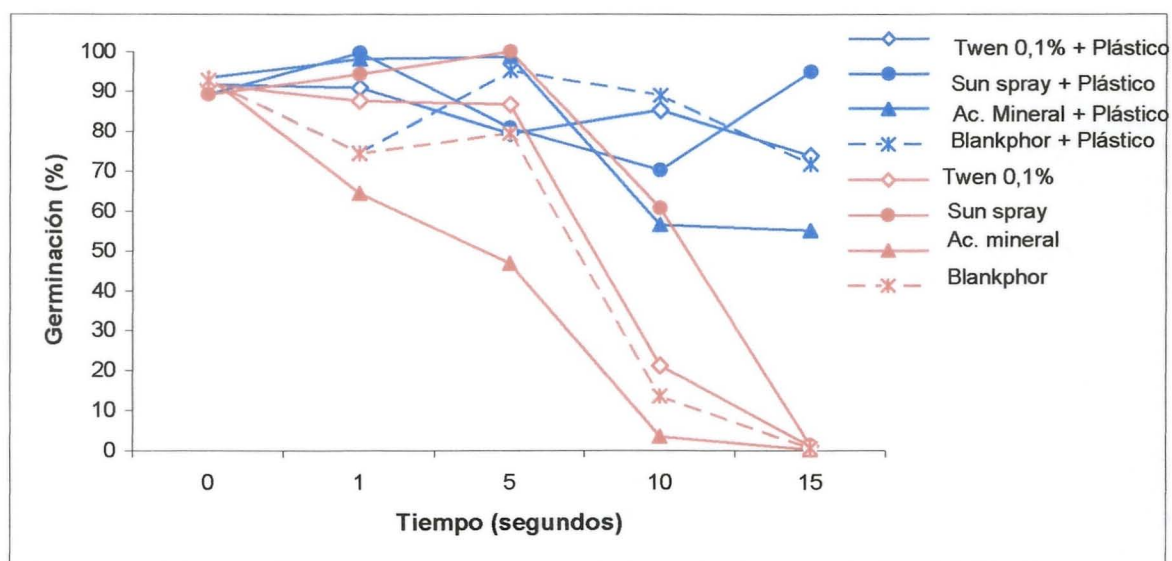


Figura 20b: Germinación de los distintos formulados de conidias de la aislación Qu-B912, expuestos en tiempos crecientes a radiación UV, con plástico anti UV (azul) y sin plástico anti UV (rojo).

Se observaron altos porcentajes de germinación de conidias, al proteger las distintas formulaciones con el plástico anti UV. Solo se observaron diferencias en el tiempo de exposición de 15 segundos, en el cual los menores porcentajes de germinación (65 y 72%) se produjeron con las conidias formuladas en aceite mineral y agua con Tween al 0.1% (Figura 21a y 21b).

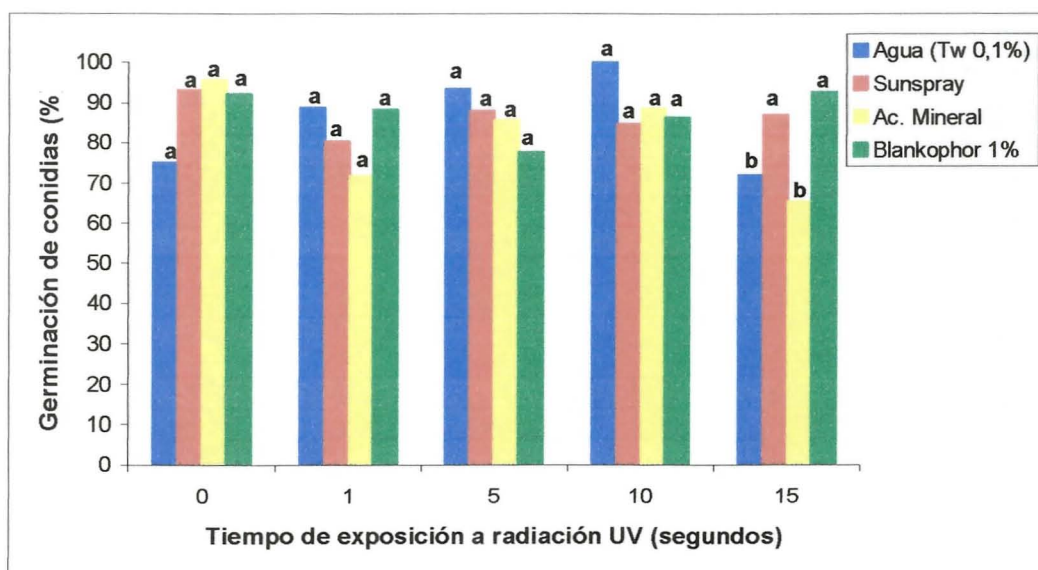


Figura 21a: Germinación de los distintos formulados de conidias de Qu-M558 cubiertos con plástico anti UV, expuestos en tiempos crecientes a luz ultravioleta.

Letras distintas entre tratamientos (formulaciones) indican diferencias estadísticas según test de Duncan ($P \leq 0,05$).

Para la aislación Qu-B912, también se observaron altos porcentajes de germinación de conidias. Sin embargo hubo diferencias estadísticas en los tiempos de exposición de 5, 10 y 15 segundos en los cuales las menores tasas de germinación (50 a 70%) se produjeron con los tratamientos de agua, aceite mineral y Blankophor.

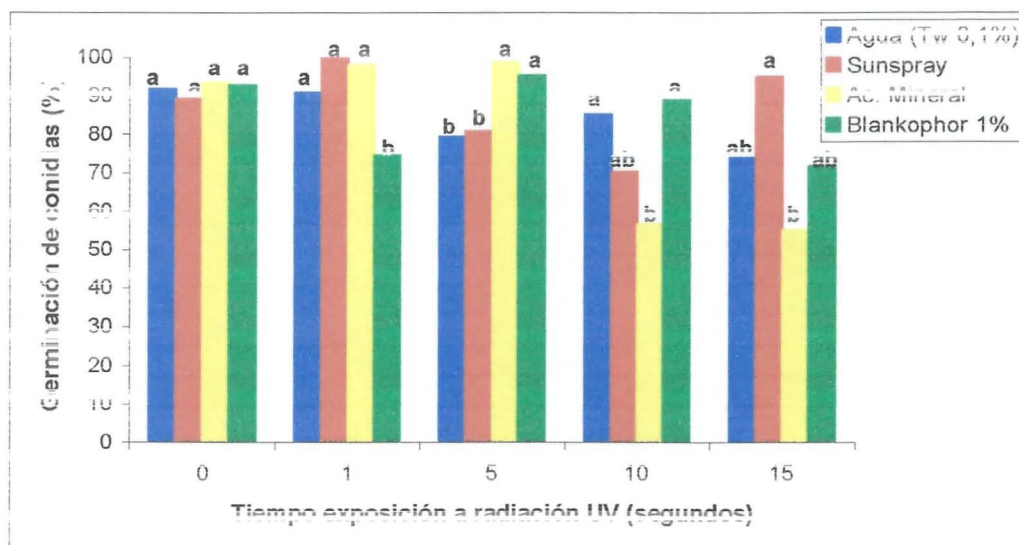


Figura 21b: Germinación de los distintos formulados de conidias de Qu-B912 cubiertos con plástico protector UV, expuestos en tiempos crecientes a luz ultravioleta.

Letras distintas entre tratamientos (formulaciones) indican diferencias estadísticas según test de Duncan ($P \leq 0,05$).

La suspensión de conidias de ambas aislaciones en aceite mineral miscible Sun Spray permite protegerlas de los efectos de la luz ultravioleta por más tiempo, que utilizando otros tipos de formulación. Solo se puede prescindir de la utilización de este tipo de protector en aplicaciones realizadas en invernaderos que estén cubiertos con plástico anti UV.

ACTIVIDAD 9. Evaluaciones en el cultivo.

Los resultados en la evaluación de la intensidad de daño por polilla del tomate en invernadero, indicaron un marcado efecto de control de los aislamientos seleccionados, los que no presentaron diferencia estadística entre ellos, todos provocaron disminución en el número de folíolos dañados por planta. Por el contrario fue notoria la diferencia entre el testigo y las plantas inoculadas con los aislamientos Qu-B912 y Qu-M558 los que disminuyeron en promedio 53.40 y 58% respectivamente el número de folíolos dañados por larvas de *T. absoluta*, la aplicación de dosis combinadas de las aislaciones provocó una disminución promedio de 49.34% de daño con respecto al tratamiento testigo (Figura 22).

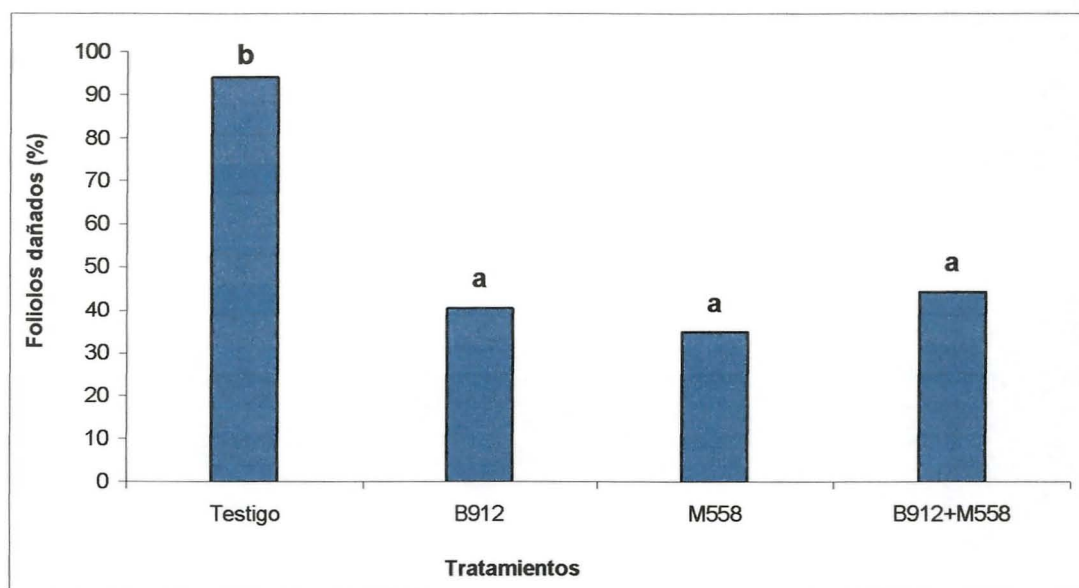


Figura 22: Porcentaje de folíolos dañados por larvas de *T. absoluta* en plantas inoculadas con Qu-B912 y Qu-M558.

Barras con letras iguales indican que no hubo diferencias entre tratamientos según test de Duncan $P \leq 0.05$.



Figura 23: Plantas no tratadas y tratadas con los aislamientos seleccionados para el control de polilla del tomate.

Además de evaluar el daño en el área foliar de las plantas utilizadas en el ensayo, se midió también el porcentaje de hojas con larvas en plantas tratadas y no tratadas con los aislamientos patógenos a *T. absoluta*, observando diferencias importantes entre las plantas testigo, sin inóculo y las tratadas con hongos entomopatógenos (Figura 24).

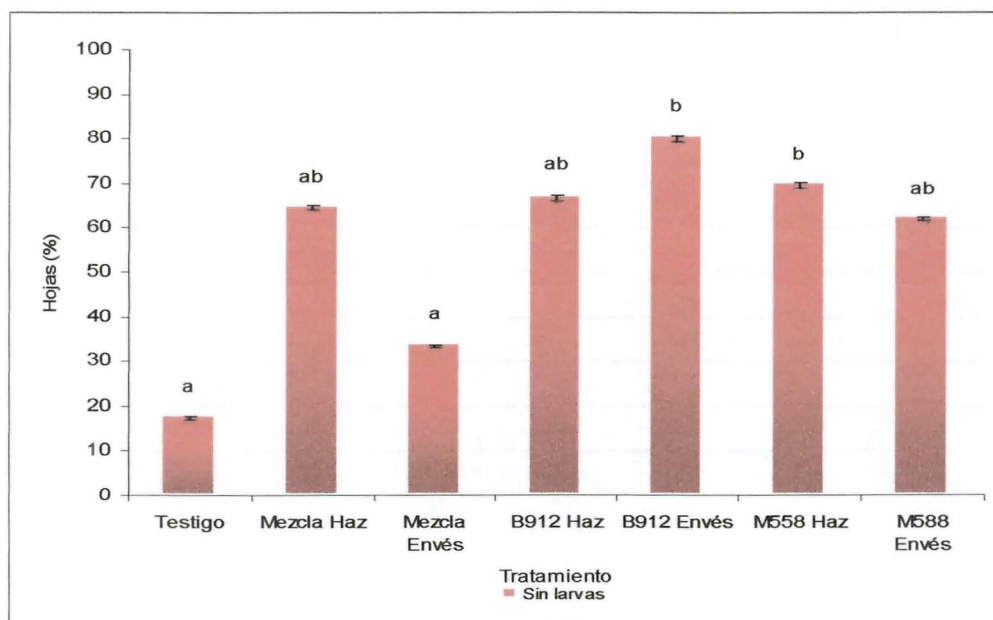


Figura 24: Porcentaje de hojas de tomate con presencia de larvas en plantas no tratadas (testigo) y tratadas con los aislamientos seleccionados para el control de *T. absoluta*.

Así también se evaluó la formación de galerías por las larvas en hojas de plantas tratadas y en las no tratadas con hongos entomopatógenos, comprobando una mayor formación de galerías en las hojas pertenecientes a las plantas del testigo (Figura 25)

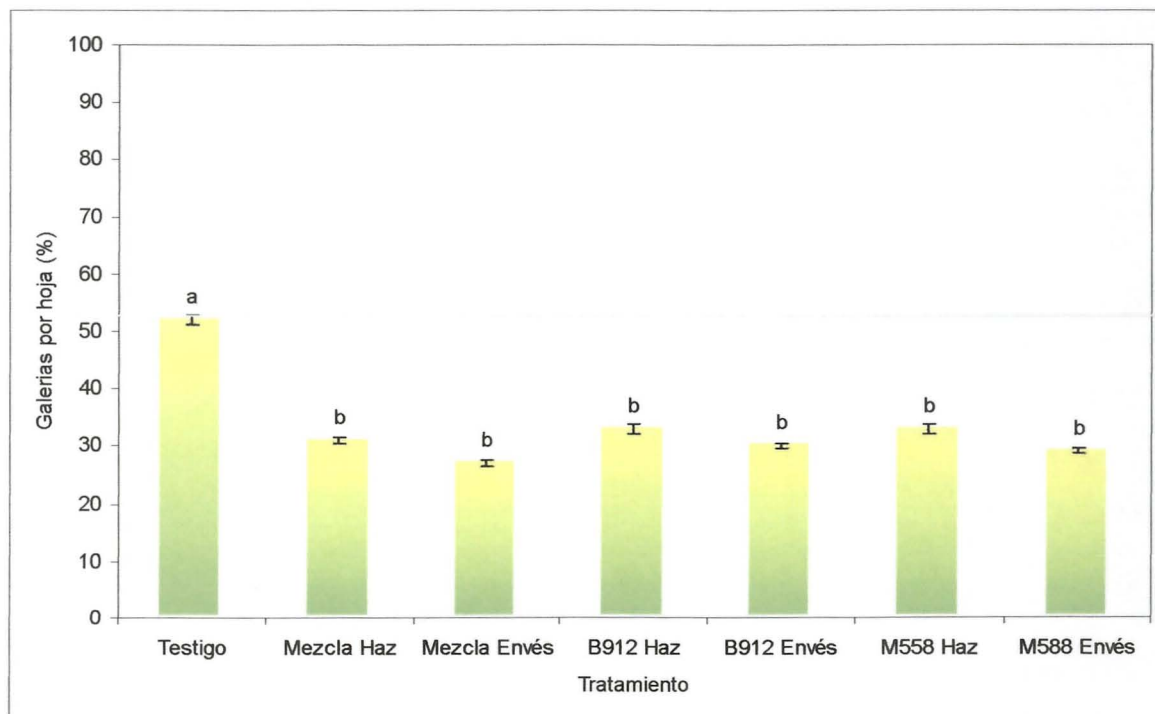


Figura 25: Formación de galerías por larvas de *T. absoluta* en hojas de plantas de tomate sin y con inóculo de los aislamientos seleccionados para el control de la plaga.

Ensayos en terreno.

Al evaluar el daño en el área foliar después de 3 semanas de aplicación continua de los aislamientos Qu-M558, Qu-B912 y la mezcla de ambos, los resultados obtenidos indicaron un efecto de control de los tratamientos con hongos. Los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos Qu-B912 y la mezcla de este con Qu-M558 con los cuales solo se produjo un 15% de daño. A su vez estos tratamientos fueron significativamente diferentes al testigo, en el cual se produjo 60% de daño(Figura 26 y 27)..

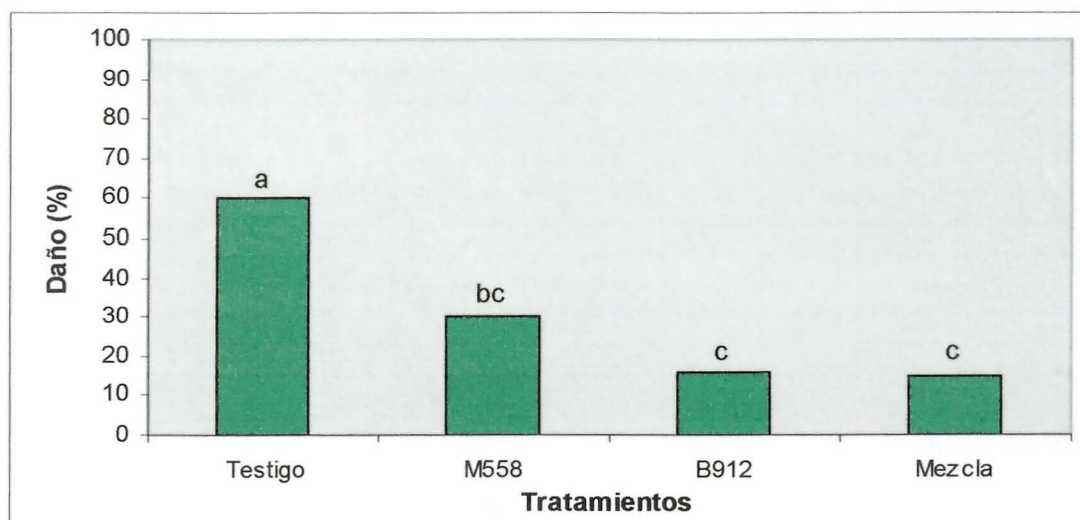


Figura 26. Daño producido por larvas de *T. absoluta* en plantas de tomate tratadas con hongos entomopatógenos.



Figura 27: Plantas de tomate sin tratar, Testigo (izq.) y tratadas con los aislamientos seleccionados para el control de polilla del tomate (der).

A pesar de que las condiciones ambientales (temperatura, humedad y radiación) son diferentes a las existentes en Quillota, los resultados obtenidos permiten inferir que existe un efecto control del biopesticida sobre polilla del tomate en terreno. Sin embargo, es necesario evaluar el efecto en invernaderos comerciales, donde estimamos que las condiciones de humedad y temperatura son mejores para el desarrollo del patógeno.

Respecto a los ensayos realizados en el invernadero de Xilema y algunos cultivos de tomate comerciales en la V región se destaca lo siguiente:

❖ Invernadero de Xilema – Ensayo 1

Efecto de los entomopatógenos sobre larvas de *Tuta absoluta*:

El control sobre *Tuta absoluta*, de *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. no presentó diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo (Cuadro 7). Tampoco se observó variaciones en el control de las larvas a medida que transcurrió el tiempo.

CUADRO 7. Efecto de los entomopatógenos *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. sobre larvas de *Tuta absoluta* a los 7, 14, 21 y 28 días de aplicados los tratamientos.

Tratamientos	Porcentaje de larvas vivas			
	7 días	14 días	21 días	28 días
	16/05/03	23/05/03	30/05/03	06/06/03
Testigo	100 ^{NS}	98.6 ^{NS}	98.6 ^{NS}	98.6 ^{NS}
B 912	100	96.0	96.0	96.0
M 558	100	100	100	100
B912+ M558	100	100	100	100

NS: no significativo ($p>0.05$)

Los resultados negativos en el control de larvas de *Tuta absoluta* se debieron a la pérdida de viabilidad de las esporas previa a su aplicación lo cual fue corroborado en un análisis posterior de laboratorio.

Efecto de entomopatógenos sobre huevos de *Tuta absoluta*:

No existió diferencia significativa entre los tratamientos y el testigo sobre el control de huevos de *Tuta absoluta* (Cuadro 8). Se evaluaron 74 huevos durante 30 días, todos eclosionaron y las larvas cumplieron su ciclo hasta el estado de pupa.

CUADRO 8. Efecto de los entomopatógenos *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. sobre huevos de *Tuta absoluta* a los 7, 14, 21 y 28 días de aplicados los tratamientos.

Tratamientos	Porcentaje de huevos vivos			
	7 días 16/05/03	14 días 23/05/03	21 días 30/05/03	28 días 06/06/03
Testigo	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}	100 ^{NS}
B 912	100	100	100	100
M 558	100	100	100	100
B912+ M558	100	100	100	100

NS: no significativo ($p>0.05$)

Los resultados negativos en el control de huevos de *Tuta absoluta* se debieron a la pérdida de viabilidad de las esporas previa a su aplicación lo cual fue corroborado en un análisis posterior de laboratorio.

❖ Invernadero de la Universidad – Ensayo 2

En este ensayo donde se evaluó el efecto de los entomopatógenos sobre larvas de Polilla del tomate presentes en las galerías de las hojas con daño, no se obtuvo efecto de los tratamientos lo que indicaría que los productos no logran controlar a larvas que ya se encuentran protegidas al momento de la aplicación.

❖ Invernadero de Xilema – Ensayo 3

Este ensayo se inició con una adecuada población de polilla inicial la cual fue en aumento en el transcurso del ensayo, además, la frecuencia de aplicación varió entre 10 y 14 días.

De los muestreos realizados en el transcurso del ensayo se obtuvo que de 116 huevos evaluados después de la aplicación de entomopatógenos ninguno desarrolló micelio y de las 115 larvas que emergieron de esos huevos, 33 larvas desarrollaron micelio del entomopatógeno después de 35 días que se iniciaron las aplicaciones, entre la penúltima y última aplicación.

Al evaluar las larvas que ya estaban en el momento de la aplicación, de 29 larvas evaluadas posaplicación, sólo 4 desarrollaron micelio, es decir un 14%, expresándose en la última aplicación.

No se encontraron larvas con micelio en muestras tomadas de preaplicación, ni lo desarrollaron en los 10 días de evaluación.

No se continuó con el ensayo debido a la excesiva presión de polilla alcanzada en el invernadero, lo que dificultó las evaluaciones y los daños se observaban similares en las plantas tratadas y testigo.

❖ Invernadero de El Guindo – Ensayo 4

Durante este ensayo las poblaciones de polilla no llegaron a niveles que permitiera evaluar el efecto del entomopatógeno aplicado. Es así como las aplicaciones de éstos sólo se realizaron entre el 25 de septiembre y el 10 de octubre, luego se suspendieron porque no había polilla en que evaluar, ni daño en las plantas, observándose el sector tratado igual al testigo.

Sin embargo, se puede destacar en este ensayo la diferencia en el mantenimiento del buen estado sanitario de las plantas, iguales en el testigo que en las tratadas pero con considerables diferencias en la cantidad de productos utilizados. Es así como el testigo recibió 6 aplicaciones de productos químicos, entre fungicidas e insecticidas, mientras que el sector tratado recibió sólo 4 aplicaciones de entomopatógenos. En ese mismo período ambos sectores recibieron QUIX para el control de adultos de Mosquita blanca en una oportunidad.

En relación al número de productos utilizados durante todo el cultivo en ambos sectores, el testigo recibió en total 26 aplicaciones de productos químicos y 2 de detergente (Quix), para el control de plagas y enfermedades; mientras que el sector tratado recibió 4 aplicaciones de entomopatógenos, 7 de productos químicos y 2 de detergente (Quix). La mayoría de los productos químicos utilizados fue de uso preventivo.

Cabe destacar, que tanto el rendimiento como la calidad de la fruta cosechada en ambos sectores fue similar, no habiendo diferencia entre ellos.

Esto último refleja el posible uso excesivo de productos químicos en los sistemas productivos tradicionales, y por otro lado, demuestra la posibilidad de trabajar en conjunto con productos químicos y biológicos, por lo menos con baja presión de plagas y enfermedades como ocurrió en este caso. Se debería evaluar bajo una mayor presión de la plaga.

❖ Invernadero de Xilema – Ensayo 5.

Como se observa en el cuadro 9 se tuvo un bajo efecto de control sobre huevos y larvas de la Polilla a través del ensayo. Respecto al control sobre un total de 215 larvas evaluadas, los tratamientos lograron un 20% de mortalidad, expresadas en larvas que desarrollaron el entomopatógeno. El comportamiento de esta mortalidad fue errático a través del tiempo fluctuando entre un 0% hasta un 87,5% (9 de marzo), cabe señalar que la dosis inicial fue aumentada hasta 5 veces a partir del 22 de marzo.

Hacia el final de las evaluaciones y debido a la alta carga de esporas en el ambiente éstas lograron alcanzar algunas larvas del tratamiento testigo provocando una mortalidad de un 27% el 28 de abril.

En relación a la mortalidad de huevos evaluados no se logró efecto de las aplicaciones, ya que, de un total de 372 huevos evaluados, el 99% de ellos eclosionaron y sólo en una ocasión (25 de marzo) se tuvo huevos muertos con esporulación.

CUADRO 9. Efecto de los entomopatógenos *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. sobre larvas y huevos de *Tuta absoluta*.

FECHA	LARVAS	LARVAS	LARVAS	HUEVOS	HUEVOS	HUEVOS
	Nº	% Vivas	% Muertas	Nº	% Vivos	% Muertos
12/1/2004	1	100	0	3	100	0
16/1/2004	0	0	0	4	100	0
22/1/2004	10	90	10	13	100	0
26/1/2004	8	87,5	12,5	4	100	0
3/2/2004	7	100	0	1	100	0
13/2/2004	2	50	50	9	100	0
19/2/2004	5	60	40	34	100	0
23/2/2004	11	91	9	36	100	0
26/2/2004	11	54,6	45,4	27	100	0
1/3/2004	12	91,7	8,3	26	100	0
4/3/2004	4	100	0	15	100	0
9/3/2004	8	12,5	87,5	8	100	0
12/3/2004	13	53,9	46,1	4	100	0
16/3/2004	22	100	0	9	100	0
19/3/2004	5	80	20	12	100	0
25/3/2004	15	33,4	66,6	32	87,5	12,5
31/3/2004	22	95,5	4,5	43	100	0
2/4/2004	23	82,7	17,3	59	100	0
14/4/2004	13	92,4	7,6	14	100	0
20/4/2004	14	92,9	7,1	17	100	0
30/4/2004	9	88,9	11,1	2	100	0
TOTAL	215	80	20	372	99	1

Debido a una alta presión de la plaga se produjeron daños importantes tanto a las plantas tratadas como al testigo (cuadro 10). Es así como, a la primera evaluación las plantas que presentaban daño alcanzaba a alrededor del 50%, tanto en el testigo como en las tratadas. Sin embargo, al observar la intensidad del daño se pudo apreciar una diferencia entre las plantas tratadas respecto al testigo. Las plantas tratadas presentaron un menor daño, con mayor follaje, menor incidencia de daño (número de hojas dañadas por planta) e intensidad (tamaño de las galerías). Es así como, en el sector tratado llegó a morir el 25% de las plantas, mientras que en el testigo murió un 65% de las plantas en el transcurso del ensayo (Anexo, Foto 11).

CUADRO 10. Efecto de los entomopatógenos *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. sobre el daño de plantas de tomate.

FECHA	TESTIGO	TESTIGO	TRATAMIENTO	TRATAMIENTO
	% Plantas con daño	% Plantas sin daño	% Plantas con daño	% Plantas sin daño
12/1/2004	48	52	60	40
22/1/2004	19	81	12	88
3/2/2004	87	13	56	44
13/2/2004	99	1	79	21
19/2/2004	100	0	86	14
26/2/2004	100	0	95	5
4/3/2004	100	0	100	0
12/3/2004	100	0	100	0
19/3/2004	100	0	100	0
25/3/2004	100	0	100	0
2/4/2004	100	0	100	0
8/4/2004	100	0	100	0
14/4/2004	100	0	100	0
20/4/2004	100	0	100	0

Al evaluar el daño en frutos a la cosecha sobre un total de 1591 frutos cosechados en las plantas tratadas el 49% presentó daño por Polilla. Respecto al testigo, sobre un total de 921 frutos cosechados el 68% presentó daño por la plaga.

Al analizar los frutos con daño se recuperaron larvas y pupas tanto en los frutos de plantas tratadas como del testigo. Para el caso de los frutos de las plantas tratadas se recuperaron 61 ejemplares (larvas y pupas) de las cuales el 46% estaban muertas y presentaban esporulación, mientras que en el testigo de un total de 67 ejemplares recuperados sólo un 3% estaban muertos y presentaban esporulación.

La muerte de ejemplares en el interior del fruto, si bien llegaron a provocar daño, representan una disminución de población para las generaciones siguientes. Por otra parte, se puede concluir que la diseminación de los entomopatógenos alcanzó a las plantas testigo llegando a provocar la muerte a un 3% de los ejemplares colectados en los frutos.

Se pudo observar, además, un mayor daño en las plantas testigo las que produjeron un promedio de 0,5 Kg por planta, mientras que las plantas tratadas su rendimiento fue de 1 Kg por planta.

❖ Invernadero Hualcapo – Ensayo 6

Como se observa en el cuadro 11 se tuvo un mejor efecto en el control de larvas que en el ensayo anterior llegando a una mortalidad de 37% sobre un total de 136 larvas evaluadas, en esta oportunidad no existió un control sobre huevos.

Cabe destacar, que respecto al ensayo anterior éste se realizó sobre un cultivo comercial con una alta densidad de plantas por hectárea, lo que podría haber favorecido un ambiente de humedad mas alto para el desarrollo de los entomopatógenos. Además, sólo se efectuaron 7 aplicaciones de entomopatógenos, con una frecuencia menor entre ellas y la dosis utilizada correspondió a la inicial del ensayo anterior y no fue variada durante el ensayo.

CUADRO 11. Efecto de los entomopatógenos *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. sobre larvas y huevos de *Tuta absoluta*.

FECHA	LARVAS Nº	LARVAS % Vivas	LARVAS % Muertas	HUEVOS Nº	HUEVOS % Vivos	HUEVOS % Muertos
16/1/2004	2	100	0	21	100	0
22/1/2004	3	100	0	15	100	0
02/2/2004	13	61,6	38,4	13	100	0
10/2/2004	28	75	25	30	100	0
16/2/2004	30	70	30	30	100	0
19/2/2004	16	12,5	87,5	26	100	0
1/3/2004	44	43,2	46,8	26	100	0
TOTAL	136	63	37	161	100	0

ACTIVIDAD 10. Evaluación del control.

Los resultados de esta prueba nos muestran que luego de 10 días de post inoculación los niveles de patogenicidad de las aislaciones Qu-B912 y Qu-M558 se mantienen, alcanzando un promedio de 60 y 50 % de mortalidad en larvas de *T. absoluta* respectivamente, la combinación de las aislaciones luego de diez días de inoculadas las plantas mantuvo un 50% de mortalidad de larvas (Figura 28).

No existe diferencia estadística entre los tratamiento pero si se aprecia notables diferencias entre la mortalidad de las larvas desde plantas inoculadas con respecto al testigo el que solo alcanzó en promedio un 30%.

Estos resultados indican que la viabilidad de las aislaciones se mantiene en condiciones de campo y demuestran que existe un efecto de residualidad de los aislamientos. Considerando que la frecuencia de aplicación de esta prueba fue de siete días, cuando las aislaciones aún mantenían en promedio un 75% de mortalidad de larvas, muestra que existe un efecto de control agregado entre las aplicaciones.

La prueba de germinación realizada a conidias recolectadas desde plantas inoculadas en invernadero a diez días de las aplicaciones mostró un 72% de germinación para Qu-B912 y 68% para Qu-M558 respectivamente

Los resultados de esta actividad deben ser complementados con nuevas pruebas en condiciones de campo para establecer tiempo de residualidad de las aislaciones bajo condiciones de mayor temperatura y radiación.

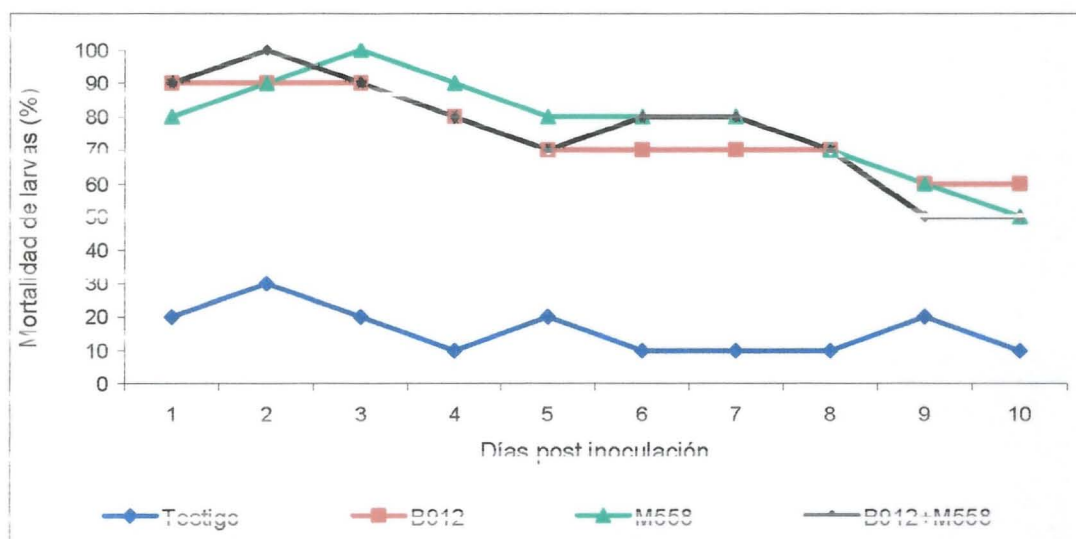


Figura 28: Mortalidad de larvas de *I. absoluta* sobre hojas a diferentes días de post inoculación



ANEXO FOTOGRAFIAS



Foto 1. Invernadero semicircular.

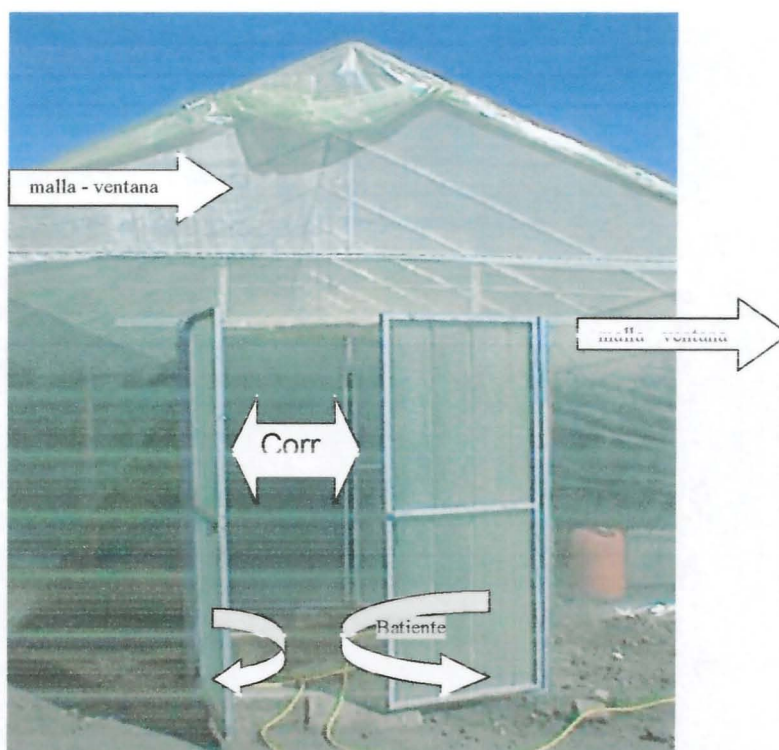


Foto 2. Frente del Invernadero. Antecámara.



Foto 3. Macetas con plantas de tomate.



Foto 5. Amarre y crecimiento de plantas de tomate.

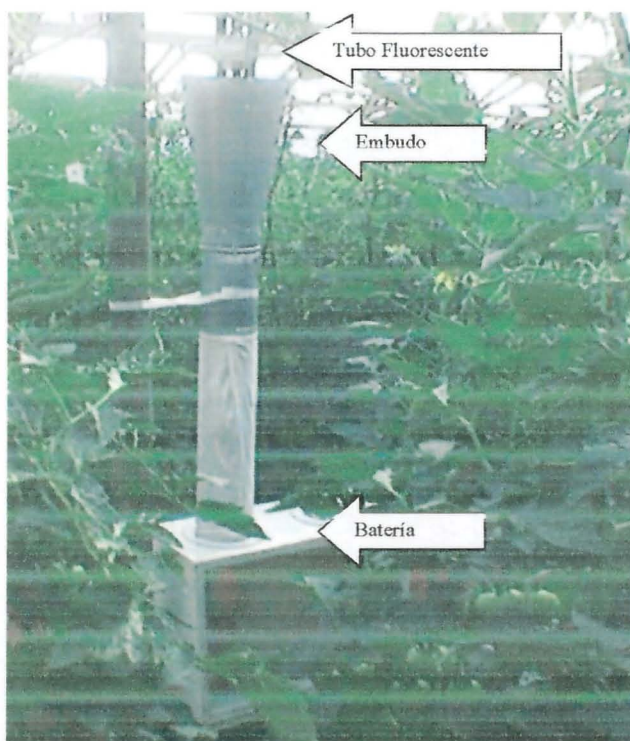


Foto 6. Trampa de Luz en invernadero comercial. Frente.



Foto 7. Trampa de Luz. Parte inferior; batería invertida.

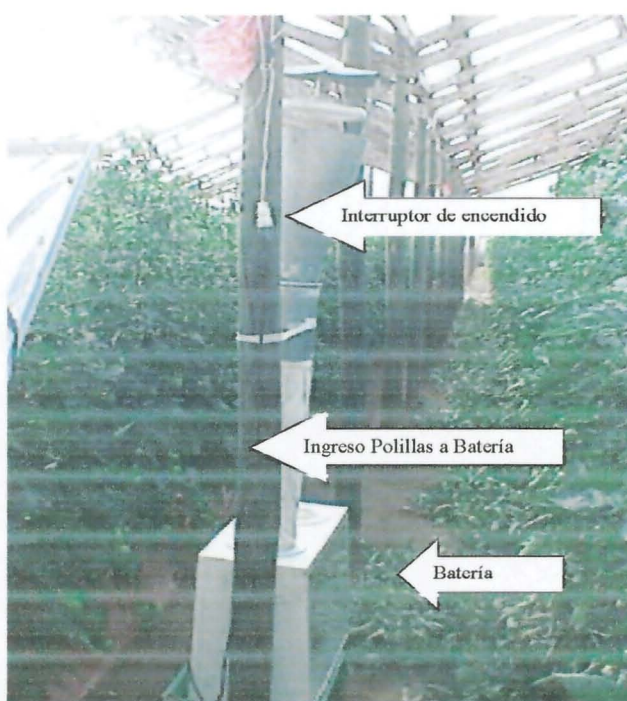


Foto 8. Trampa de Luz. Costado.

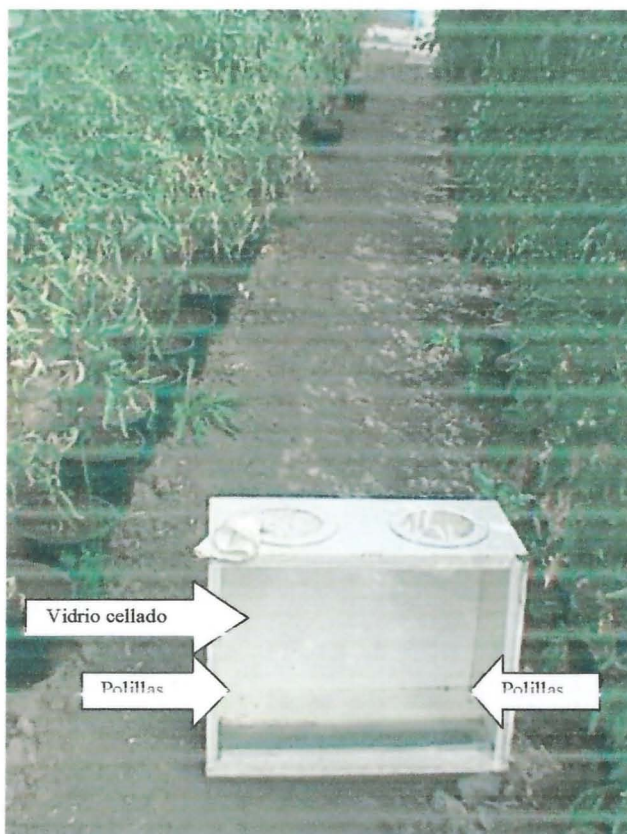


Foto 9. Liberación de Polillas. Batería cerrada, dispuesta en pasillo.

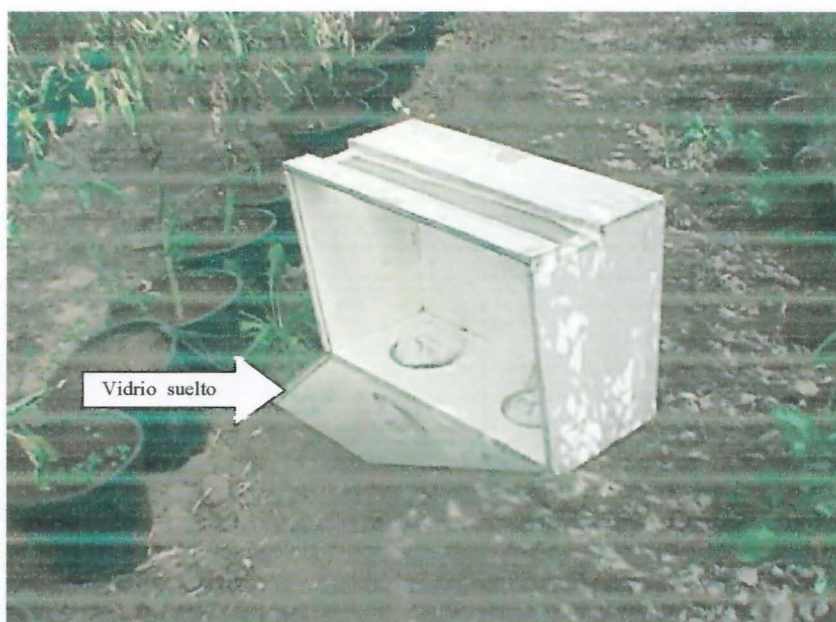


Foto 10. Liberación de Polillas. Batería abierta.



Foto 11. Plantas de tomate en Invernadero Xilema. Tratadas derecha. Testigo izquierda.

14. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

ACUÑA, A y CARBALLO, M. 2000. Comparación de una cepa de *Beuveria bassiana* con insecticidas utilizados para el control de *Plutella xylostella*. Manejo Integrado de Plagas 56: 52-57

ALVAREZ, M., M. GERDING y A. FRANCE. 1998. Control de *Calioa cerasi* (L.) con hongos entomopatógenos. Tesis de Ingeniero Agrónomo, Universidad Adventista de Chile, Chillán. 35 p.

ALVES, S., J. ALMEIDA, A. MOINO y L. ALVES. 1998. Interacción entre entomopatógenos parasitoides y predadores. pp. 195-217 in: S. Alves (Ed.). Controle microbiano de insetos (2° ed.). FEALQ, Piracicaba, Brasil. 1163 p.

APABLAZA, J. 1992. La polilla del tomate y su manejo. Tattersal 79: 12-13

_____ 1990. Solanaceae, tomate y otras solanáceas. In: Latorre, B. Plagas de las hortalizas. Santiago, FAO. pp. 275-398

_____ 1984. Incidencia de insectos y moluscos plagas en siete hortalizas cultivadas en las regiones V y Metropolitana, Chile. Ciencia e Investigación Agraria 1(1): 15-25

ARTIGAS, J. 1994. Entomología económica: Insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario. Concepción, Ediciones Universidad de Concepción. 943p.

ASOCIACIÓN NACIONAL DE FABRICANTES E IMPORTADORES DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS AGRÍCOLAS A.G. 2002. Manual fitosanitario 2002-2003. Santiago, AFIPA. 731p.

BARNETT, H and HUNTER, B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Minnesota, APS Press. 218p.

BARRIENTOS, R. 1997. Determinación de la constante térmica de desarrollo para la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Tesis Ing. Agr. Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 44p

BUTT, T.M. and M.S. GOETTEL. 2000. Bioassays of entomopathogenic fungi. pp: 141-196, in: Navon, A. and K.R.S. Ascher (Eds.). Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CABI Publishing. Wallingford, UK.

CAMPOS, R. 1976. Control químico del "Minador de las hojas y tallos de la papa" (*Scrobipalpula absoluta* M.) en el Valle de Cañete. Revista Peruana de Entomología 19:102-106

CARBALLO, M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. Hoja técnica. Manejo Integrado de Plagas 47: 1-4

CARBALLO, R.P. 1995. *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick), "polilla del tomate". 101-106p. In: Lepidópteros de importancia económica: Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales Vol. I (C.M. Bentancourt y I.B. Scatoni Eds.). Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. 122p.

CHARUDATTAN, R; WYSS, G and CHANDRAMOHAN, S. 2002. Biological control: In: Pesticides in agriculture and the environment. New York, Marcel Dekker. 330 p.

CISTERNAS, E., A. FRANCE y M. GERDING. 1998. Control de *Listronotus bonariensis* con *Beauveria bassiana* en praderas en el sur de Chile. Pp. 145, in: Anais do VI SICONBIOL. Río de Janeiro, Brazil. 226 p.

CONTRERAS, T; CARBALLO, M; HIDALGO, E y BUSTAMANTE, E. 1997. Evaluación de trampas de pseudotallo y formulaciones de *Beauveria bassiana* (Bals.) en el combate del picudo del plátano *Cosmopolites sordidus* en costa rica. Manejo Integrado de Plagas 46: 44-49

CORNELL UNIVERSITY. 2003. Biological control: a guide to natural enemies in North America, (on line). www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol.

DEBACH, P. 1968. Control biológico de las plagas e insectos y malas hierbas. México, CECSA Continental. 949p.

DEVOTTO, L., GERDING, M. y FRANCE, A. 2003. Hongos entomopatógenos, (on line). www.inia.cl/cobertura/quilamapu/bioleche/BOLETIN23.html

DORTA, B. y A. ARCAS. 1996. Producción de hongos entomopatógenos. Pp. 195-206, en: Lecuona, R. (Ed.). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Buenos Aires, Argentina. 338p.

DUIMOVIC, A. 1998. La polilla del tomate dejó de ser una plaga en los cultivos de la provincia de Quillota. Empresa y Avance Agrícola 56: 18

DUTKY, S.R. 1957. Report on white grub control project in Chile. Agricultura Técnica (Chile) 17(2):92-105.

ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. 2003. What are biopesticides?, (online). www.epa.gov/pesticides/biopesticides/whatarebiopesticides.htm

ESTAY, P. y BRUNA, A. 2002. Insectos, ácaros y enfermedades asociadas al tomate en Chile. Santiago, INIA La Platina. 111p.

ESTAY, P. 2001. Primer curso "Manejo integrado de plagas y enfermedades en tomate". Santiago, INIA La Platina. 122 p. (Serie actas N° 12).

_____. 2000. Polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). Informativo La Platina 9: 1-4

_____. 1998. Estados Unidos: un nuevo Mercado de exportación para tomates chilenos. Agroeconómico 46: 35-38

ESTAY, P. 1993. Plagas del tomate y pepino de ensalada bajo plástico y su

control. *In*: Producción de hortalizas protegidas bajo plástico. Santiago, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental La Platina. Pp 9-1,15. (Serie La Platina N° 20).

ESTAY, P. 1993. Mosquita blanca de los invernaderos. Una plaga de carácter secundario, transformada en primaria , en tomates bajo plástico y diversas hortalizas en la zona de Quillota. Investigación y Progreso Agropecuario, La Platina (INIA) 78:30-36.

ESTAY, P. y Rojas, S. 1999. Control biológico de la mosquita blanca de los invernaderos. Revista Empresa y Avance Agrícola. Año VIII (65):12-13.

EYZAGUIRRE, A.J. 1986. Plagas del fruto y sus poblaciones en tomate plantado en tres fechas distintas y control en base a estados de desarrollo de *Scrobipalpula absoluta*. Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 76 p.

FERNANDEZ, S. y MONTAGNE, A. 1990a. Biología del minador del tomate, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Boletín de Entomología Venezolana. N. S. 5(12): 89-99

_____ 1990b. Preferencia de oviposición de las hembras y duración, crecimiento y sobrevivencia de las larvas de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) en diferentes solanáceas. Boletín de Entomología Venezolana. N. S. 5(13): 100-106.

FERRON, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review Entomology 23: 409-442

FRANCE, A., GERDING, M., SANDOVAL, A., ESPINOZA, S. y VIVANCO, E. 1999. Patología de insectos. Chillán INIA Quilamapu 119p. (Serie Quilamapu N° 122).

FRANCE A., M. GERDING y E. CISTERNAS. 1998. Colección de hongos entomopatógenos nativos para el control biológico de insectos plagas. Pp. 54, in: Resúmenes XX Congreso Nacional de Entomología. Universidad de Concepción, Concepción. 79 p.

GARAY, X.L. 1987. Evaluación de varios insecticidas contra la polilla del tomate (*Scrobipalpula absoluta*) y la polilla del frejol (*Epinotia aporema*). Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile. 118 p.

GERDING, M. Y A. FRANCE. 1998. Evaluación de *Metarhizium* spp. nativos para el control de *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae). Tesis de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Concepción, Chillán, Chile. 29 p.

GERDING, M. 2003. Agentes de control biológico de plagas, (on line). www.inia.cl/cobertura/quilamapu/bioleche/BOLETIN16.html

GIUSTOLIN, T., VENDRAMIN, J., ALVES, S. y VIEIRA, S. 2001. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) criada em dois genótipos de tomateiro. Neotropical entomology 30(3): 417-421

GOMES, M., TINTI, N. and LUNA ALVES, E. 1997. Characterization of new biotypes of P157 strain of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, got by treatment with gamma radiation. Boletín Micológico 12(1-2): 41-48

GONZÁLEZ, R. 1989. Insectos y ácaros de importancia cuarentenaria en Chile. Santiago, Ograma S.A. 310 p.

HERNÁNDEZ-ROSAS, F. y ALATORRE, R. 2003. Naturaleza polimórfica de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. aislada de broca del café, *Hpothenemus hampei* Ferrari, (on line). orbita.starmedia.com/cveracruz/doctorales.htm.

HERRERA, F; CARBALLO, M y SHANNON, P. 1999. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bemisia tabaci*, en laboratorio. Manejo Integrado de Plagas 54: 44-52

JIMÉNEZ, R., GALLO, P. y SILVA, E. 1989. Susceptibilidad de larvas de lepidópteros al nemátodo *Steinernema carpocapsae* (Steinernematidae). IDESIA 11: 49-51

JIMÉNEZ, M; BOBADILLA, D; VARGAS, H; TACO, E y MENDOZA, R. 1998. Nivel de daño de *Tuta absoluta* (Meyrick), (Lepidóptera: Gelechiidae), en cultivos experimentales de tomate sin aplicación de insecticidas convencionales. Sociedad Chilena de Entomología Universidad de Concepción. XX Congreso Nacional de Entomología. Concepción, 11, 12 y 13 de noviembre 1998. pp. 43-51.

LARRAÍN, P. 1992. Plagas en cultivos bajo plástico. IPA La Platina 73: 41-52

_____ 1987a. Plagas del tomate, primera parte: Descripción, fluctuación poblacional, daño, plantas hospederas, enemigos naturales de las plagas principales. IPA La Platina 39: 30-35.

_____ 1987b. Plagas del tomate, segunda parte: Manejo integrado. IPA La Platina 39: 36-38

_____ 1986a. Evaluación de la mortalidad total y parasitismo por *Dineulophus phthorimaeae* (De Santis) (Hym, Eulophidae) en larvas de la polilla del tomate *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick). Agricultura Técnica 46(2): 227-228

LARRAÍN, P. 1986a. Eficacia de insecticidas y frecuencia de aplicación basada en niveles poblacionales críticos de *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick), en tomates. Agricultura Técnica (Chile) 46(3): 329-333.

LEITE, G., PIKANÇO, M., AZEVEDO, A., ZURITA, Y. y MARQUINI, F. 1998. Oviposición y mortalidad de *Tuta absoluta* en *Lycopersicon hirsutum*. Manejo Integrado de Plagas 49: 26-34

LECUONA, R. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Talleres gráficos Mariano Mas, Buenos Aires, Argentina. 338 p.

LECUONA, R., B. PAPIEROK y G. RIBA 1996. Hongos entomopatógenos. Pp. 35-60, en: Lecuona, R. (Ed.). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Talleres gráficos Mariano Mas, Buenos Aires, Argentina. 338 p.

LÓPEZ, E. 1997. Uso comercial de abejorros polinizadores (*Bombus*) . Revista Empresa y Avance Agrícola 46:8-9.

LÓPEZ, E. y GARAY, X. 1999. Uso de *Bombus terrestris* como polinizador de frutos de tomate en invernadero. Revista Horticultura del Mercosur. Año 3 (9):20-23.

LÓPEZ, E. 2000. Manejo de plagas en sistemas de producción intensiva. Seminario Internacional: Adaptaciones tecnológicas para la modernización de cultivos forzados. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Quillota, 12 y 13 de octubre.

_____. 1991. Polilla del tomate: Problema crítico para la rentabilidad del cultivo de verano. Empresa y Avance Agrícola 1(5): 6-7

MALAIS, M. y RAVENSBERG, W. 1991. La biología de las plagas de invernadero y sus enemigos naturales. Koppert. 109p.

MESQUITA, L., PEREIRE, I. and LUNA-ALVES, E. 1996. Scanning electron microscopy of vegetative and reproductive structures from *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains stored in mineral oil. Boletín Micológico 11(1-2): 81-86

MONZÓN, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas 63: 95-103

MURPHY, B., MORISAWA, T., NEWMAN, J., TJOSVOLD, S. and PARRELLA, M. 1998. Fungal pathogen controls thrips in greenhouse flowers. *California Agriculture* 52(3): 32-36

OROZCO, M; FARÍAS, J; LÓPEZ, J y RAMÍREZ, N. 2000. Uso de *Beauveria bassiana* para el control de *Bemisia argentifolii* en melón. *Manejo Integrado de Plagas* 56: 45-51

PANIAGUA, A. 2002. Prospección y aislamiento de cepas de entomopatógenos nativos para control biológico de la polilla del tomate *Tuta absoluta* Meyrick. Taller de licenciatura. Ing. Agr. Quillota. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 64 p.

PELL, J. K. and H. E. ROY. 2002. Interactions between entomopathogenic fungi and predators. Toward the Integration of Fungal Entomopathogens with Other Biological Control Agents. VIII International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. XXXV Meeting of the SIP. VI International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Foz de Iguassu. Brasil. 18-23 de Agosto.

PRADO, E. 1991. Artrópodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. Santiago, INIA. 207p.

RIPA, R., ROJAS, S. y RODRIGUEZ, F. 1990. Consideraciones sobre el control de la polilla del tomate. *IPA La Platina* 68: 20-24

RIPA, R. y CALTIGIRONE, L. 1990. Control integrado de plagas. *El Campesino* (Chile) 121(8): 32-34

RIPA, R. y ROJAS, S. 1984. Plagas de hortalizas. *IPA La platina* 23: 32-34

RODRIGUEZ, M., VÁZQUEZ, R., RODRIGUEZ, M., CARMONA, E., LASTRES, J. y TÉLLEZ, M. 1993. Programa de manejo integrado en cultivo de tomate bajo plástico en Almería. Andalucía, Junta de Andalucía. 98 p.

RODRIGUEZ, S; RODRIGUEZ, C; Riestra, D; VILLANUEVA, J y RODRIGUEZ, D. 2002. Influencia de la luz y de aditivos naturales sobre la germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas* 64: 34-40

ROJAS, S. 1997. Establecimiento de enemigos naturales. Agricultura Técnica 57(4): 297-298

_____. 1981. Control de la polilla del tomate: enemigos naturales y patógenos. IPA La Platina 8: 18-20

SALAZAR, E. y ARAYA, J. 2001. Respuesta de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), a insecticidas en Arica. Agricultura técnica 61(4): 429-435

SAMSON, R., H. EVANS, and J. LATGE. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, Netherlands. 187 p.

SANDOVAL A. y A. FRANCE. 1998. Evaluación del hongo *Beauveria* spp. Como potencial agente controlador del coleóptero *Asynonychus cervinus* (Boheman). Tesis de Ingeniero Agrónomo, Universidad Adventista de Chile, Chillán. 42 p.

SEGOVIA, M. 1997. Monitoreo de la polilla del tomate *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick), en cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo plástico en la zona de Quillota. Taller de Licenciatura Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 76p.

SMITS, P. 1997. Insect pathogens: Their suitability as biopesticides. In: BCPC Symposium Proceedings eds. Microbial insecticides: Novelty or necessity?. Farnham, British Crop Protection Council. N° 68 pp. 21-28

SEWIFY, G; ABOL-ELA, S and ELDIN, M. 2000. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) and *Granulosis Virus* (GV) combinations on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (ZELLER) (Lepidoptera: Gelechiidae). Bulletin Faculty of Agriculture University of Cairo. 51(1): 95-106

TACO, E., QUISPE, R., BOBADILLA, D., VARGAS, H. JIMÉNEZ, M. y MORALES, A. 1998. Resultados preliminares de un ensayo de control biológico de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), en el valle de Azapa. IX Congreso Latino-Americano de Horticultura. Santiago, 30 de Noviembre al 3 de diciembre de 1998. pp.54-56

UCHOA-FERNANDES, M., DELLA LUCIA, T. y VILELA, E. 1995. Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Annais da Sociedade Entomologica do Brasil 24(1): 159-164

VARGAS, R. 1996. Resistencia en el control de plagas, un impacto económico no valorado en los costos de producción. *Empresa y Avance Agrícola* 42: 9-11

VARGAS, H. 1970. Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorismoschema absoluta* (Meyrick) (Lep. Gelechiidae). *IDESIA* 1: 75-110

VARGAS, R. y ALVEAR, A. 1999. Resistencia de la mosquita blanca a Metomilo. *Revista Tierra Adentro* 27:28:31.

VÁSQUEZ, J. 1977. Antagonistas de larvas Scarabeidae presentes en las praderas de la provincia de Valdivia. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Austral, Valdivia, Chile. 50 p.

VARGAS, R. 1996. Resistencia en el control de plagas, un impacto económico no valorado en los costos de producción. *Empresa y Avance Agrícola* 42: 9-11

VARGAS, H. 1970. Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorismoschema absoluta* (Meyrick) (Lep. Gelechiidae). *IDESIA* 1: 75-110

VARGAS, R. y ALVEAR, A. 1999. Resistencia de la mosquita blanca a Metomilo. *Revista Tierra Adentro* 27:28:31.

VÁSQUEZ, J. 1977. Antagonistas de larvas Scarabeidae presentes en las praderas de la provincia de Valdivia. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Austral, Valdivia, Chile. 50 p.

**Control biológico de la polilla del
tomate (*Tuta absoluta*) mediante
integración de organismos
entomopatógenos**



CO1-1-A-008

Ejecutor :
Xilema S.A.
Asociados:
INIA, Quilamapu

Coordinador :
Eduardo López Lapport

Noviembre de 2001 - agosto de 2004

OBJETIVO GENERAL :

Disminuir el uso de pesticidas químicos en el control de "*Tuta absoluta*" mediante la selección, formulación y dosificación de un biopesticida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos y *Bacillus thuringiensis* específicos para el control de "*Tuta absoluta*".
- Formulación de un biopesticida de largo efecto residual y capaz de proteger al organismo entomopatógeno contra la desecación y radiación UV.
- Evaluación de la efectividad de *Bacillus thuringiensis* y hongos entomopatógenos en condiciones de terreno y su complementariedad con los insectos benéficos *richogramma* sp., *Encarsia formosa*, *Bombus terrestris* y *Apis mellifera*.
- Transferir el conocimiento adquirido a los agricultores, asesores de cultivos de tomate, ingenieros agrónomos y estudiantes de Agronomía.

Localización:

Los trabajos de laboratorio, aislamiento, selección y multiplicación de entomopatógenos : Centro Regional de Investigaciones Quilamapu del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Chillán.

La crianza para el abastecimiento de larvas de polillas del tomate y los ensayos de campo fueron realizados en Xilema S.A., en Quillota y en predios con cultivo de tomate en la misma zona

Metodología

1.- Crianza *Tuta absoluta*

• Instalación invernadero circular



Metodología



- Plantas en maceta
- Inoculación sobre plantas buen desarrollo

Metodología

- Instalación trampas de luz, en UCV



Metodología

- Implementación invernadero en UCV (temporal junio 2002)
- Cultivo tomates en INIA Quilamapu
- Inoculación adultos de polilla,
- Hasta una presión de 80 adultos por planta

Metodología

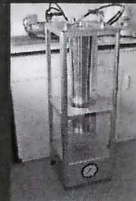
- 2.- Colecta hongos entomopatógenos
- Muestras de suelo
- Suelos cultivados (no fumigados) y áreas silvestres
- 3.- Aislamiento y criopreservación
- Cebado de suelo con polilla de la cera
- Cultivo en placa petri
- Criopreservación de esporas

Metodología

- 4.- Evaluación hongos entomopatógenos
- Placas petri : larvas y huevos
- Porcentaje de mortalidad, emergencia larva y esporulación.
- 5.- Pruebas con insectos benéficos
- Trichogramma sp*, *Encarsia formosa*, abejas y abejorros.

Metodología

- 6.- Prueba dosis y tiempo letal
- Aislamiento Qu-B912 y Qu-M558
- Diferentes concentraciones de esporas/ml
- Torre de Potter



Metodología

7.- Formulación resistente a desecación

- Extracción de conidias, pruebas de resistencia a la deshidratación (niveles de humedad)
- Evaluación de germinación

8.- Formulación resistente a luz u.v.

- Suspensión con humectante, aceite mineral puro y miscible y protector solar
- Exposición a luz u.v.
- Porcentajes de germinación

Metodología

9.- Evaluaciones en cultivo

Quilamapu (1):

- 7 aplicaciones en 7 semanas
- 2 invernadero frecuencia c/ 4 días, por 6 semanas

Xilema, Quillota (2)

- enero-mayo 2003, 1 –6 larvas/hoja, aplicación bomba manual.
- Evaluación sobre larvas y sobre huevos

Metodología

Xilema, Quillota, (3)

- 5 aplicaciones frecuencia variable
- aplicación bomba manual.
- Se mejoró el mojamiento, hora de aplicación,

Invernadero el Guindo (4):

Invernadero comercial, frecuencia: 4 aplicaciones, no se continuó por baja presión de polilla.

Metodología

Xilema, Quillota, (5)

- Aumento frecuencia aplicación y dosis de entomopatógenos, 21 aplic en 3 meses, c/ 3-7 días.
 - Aplicación también al suelo
 - Equipo aplicación : ultra bajo volumen
- Invernadero Hualcapo, Hijuelas (6)
- 10 aplicaciones en 1,5 meses, frecuencia 3-8 días
- Bomba tradicional

RESULTADOS

- Colecta hongos entomopatógenos :
26 HEP : 24 Beauveria sp, 4 Metarrizium
 - Evaluación HEP
- Mejor mortalidad y esporulación
- Qu-B911
- Qu-B912
- Qu-B928
- Qu-M558

RESULTADOS

- Determinación dosis
 - Efecto sobre insectos benéficos
 - Formulación
- QuB912 buena resistencia a la deshidratación, germinación sobre 90% a diferentes % de humedad de conservación
- Mezclado con aceite mineral
- Sun Spray



RESULTADOS

Ensayos en Quilamapu



RESULTADOS

Ensayos en terreno

- Quilamapu (1)

Mejor cepa :
QuB912 + Qu M558

Tratamiento 15% daño
Testigo 60% daño



RESULTADOS

Ensayos en terreno

Xilema (2)

Control no diferencias significativas (pérdida
viabilidad de esporas)

Xilema (3)

Excesiva presión de polilla

frecuencia cada 10-14 días

115 larvas : 33 desarrollaron micelio

RESULTADOS

Ensayos en terreno

- El Guindo (4)

- Población de polillas muy bajas

- Se suspendieron aplicaciones en octubre

Testigo 6 aplicaciones : Total 26 aplicaciones productos
químicos + 2 detergente

Tratamiento 4 aplicaciones : Total 11 aplicaciones
productos químicos + 2 detergente

RESULTADOS

Ensayos en terreno

Xilema (5)

- 20% mortalidad
- dosis aumentada 5 veces, al final mortalidad 27%
- no hubo efectos sobre huevos
- Alta presión de plaga, alto daño, pero efecto sobre intensidad del daño.
- Tratamiento muerte 25% plantas, Testigo muerte 65% plantas.
- Frutos tratamiento 49% daño Testigo 68% daño.

RESULTADOS

Ensayos en terreno

Hualcapo (6)

mejor control 37%

Principales problemas enfrentados:

- Falta de agricultores dispuestos a utilizar la tecnología y a modificar sus manejos
- Gestión y seguimiento ensayos
- Formulación requiere constante agitación
- Resultados poco concluyentes

SITUACION ADMINISTRATIVA

- Financiamiento solicitado \$63.828.386.-
- Aportes entregados \$58.362.287.-
- Bienes en comodato \$2.720.436.-
 - Invernadero
 - Logger T° y humedad
- Saldo disponible \$4.362.732 a favor del Ejecutor