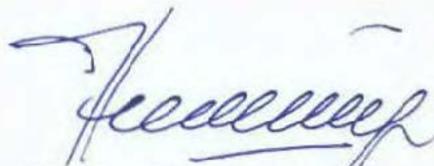


**INFORME TECNICO FINAL****I. ANTECEDENTES GENERALES**

Nombre del proyecto	Mejoramiento genético de la cochinilla para la producción de ácido carmínico
Código	V99-0-A-017
Región:	IV y Metropolitana
Institución ejecutora	Universidad de Chile, Facultad de Ciencias
Agente asociado	Tunantes SA
Coordinador	Hermann Niemeyer Marich
Costo total	\$ 162.770.551
Aporte FIA	\$ 95.424.732
Periodo de ejecución	Agosto 1999 – Diciembre 2003



Hermann Niemeyer Marich

Firma Coordinador del Proyecto

USO INTERNO DEL FIA

Fecha de Presentación:

## II. RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto estuvo dirigido hacia incrementar la concentración de ácido carmínico (CAC) acumulado por la cochinilla, *Dactylopius coccus* Costa, criada sobre plantas de tuna, *Opuntia ficus indica* Mill. (Cactaceae). La evaluación de la CAC después de realizar cruces aleatorios y recíprocos entre diversas líneas de cochinilla sugirió un efecto genético débil acoplado a un efecto materno no genético también débil. El estudio durante dos temporadas del efecto de diversos factores bióticos sobre la CAC indicó que ésta puede ser incrementada mediante riego, fertilización y prácticas culturales que amortigüen los efectos estacionales. El proyecto contribuyó a crear las condiciones para que el número de personas dedicadas a la crianza de cochinilla en el valle del Elqui pueda experimentar un notable incremento, particularmente entre aquellas poseedoras de predios con pequeñas superficies. Se postulará a una prolongación del proyecto que permita hacer los estudios sociales necesarios para definir el universo de potenciales usuarios de los resultados del proyecto, y producir los paquetes tecnológicos destinados a los distintos tipos de usuarios.

## III. TEXTO PRINCIPAL

### III.1 Resumen de la propuesta original y modificaciones

El objetivo general del proyecto fue incrementar y homogeneizar el contenido de ácido carmínico de la cochinilla, *Dactylopius coccus* Costa. Sus objetivos específicos fueron: 1) montar un método de análisis de ácido carmínico en insectos individuales, 2) seleccionar una población inicial de cochinillas chilenas (y eventualmente peruanas, si la variabilidad de la cochinilla chilena resultaba insuficiente), 3) estimar los componentes de la herencia de la concentración de ácido carmínico (CAC), y 4) infestar con cochinilla mejorada predios de Tunantes SA.

### **III.2 Cumplimiento de los objetivos del proyecto**

Se puso a punto un método para el análisis de ácido carmínico en hembras oviplenas de cochinilla. Se verificó que la CAC en los predios de Tunantes SA mostraban una gran variabilidad, y que las mayores CAC determinadas no difirieron grandemente del promedio de la población. Se realizaron experimentos de cruces dirigidos, con resultados parcialmente exitosos: aunque no pudo determinarse la heredabilidad de la CAC, se infirió la ocurrencia de herencia materna no genética. Se infestó extensiones considerables en predios de Tunantes SA con cochinillas seleccionadas por su alta CAC y cochinilla proveniente de cruces aleatorios entre cochinillas seleccionadas por su alta CAC. Adicionalmente, se evaluó el efecto de diversos factores bióticos sobre la CAC.

En virtud de lo anterior, los objetivos 1, 2 y 4 fueron cumplidos. No fue posible cumplir cabalmente el objetivo 3, en parte debido a las características biológicas de la especie y tal como se describe más adelante, debido a las condiciones ambientales particularmente fluctuantes experimentadas durante el desarrollo del proyecto.

El proyecto logró establecer que se deberá comprender más profundamente la fisiología y herencia del insecto, para poder realizar el mejoramiento genético de la cochinilla a través del un sistema de cruces. Algunos de los efectos bióticos estudiados permitirán diseñar prácticas culturales que podrán incrementar levemente la CAC.

### **III.3 Aspectos metodológicos del proyecto**

#### **Análisis de la concentración de ácido carmínico (CAC) en insectos individuales**

El estudio de factores que inciden sobre la concentración de ácido carmínico en la cochinilla requiere poder medir esta variable con exactitud y reproducibilidad. Los métodos analíticos previamente descritos en la literatura (*e.g.* González *et al.* 2002) han sido enfocados hacia el

análisis de muestras comerciales provenientes de grupos de insectos, y no de individuos específicos, por lo que un nuevo método para cuantificar ácido carmínico en extractos de cochinillas individuales debió ser desarrollado. Este método debía ser, además de exacto y reproducible, lo suficientemente rápido como para permitir analizar cientos de muestras en un período breve de tiempo.

Se estudió la influencia de distintos factores sobre la exactitud y reproducibilidad de los resultados obtenidos en los análisis. Las variables estudiadas guardaron relación con: i) la capacidad para extraer el ácido carmínico desde los tejidos del insecto, generando soluciones homogéneas que condujeran a valores reproducibles de absorbancia, y ii) el efecto sobre la estabilidad del ácido carmínico una vez solubilizado o todavía contenido en el insecto muerto.

El método finalmente utilizado es el siguiente: se colectan los insectos individuales en la fase de hembra ovípara a punto de iniciar la oviposición, se secan en una estufa con circulación de aire a 50° C por 72 horas<sup>1</sup>, se pesan y luego se sumergen en 1 ml de hexano contenido en un tubo Eppendorf y se agita con el fin de eliminar la cera que los recubre. Luego de descartar el hexano, se agrega a cada individuo 4 mL de solución amortiguadora de pH 6 (obtenida agregando 56 mL de NaOH 0,1 M a 500 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M), se sonica la suspensión durante 3 horas y luego se muele el material sólido en morteros individuales. De esta suspensión se extrae una alícuota de 0,6 mL. Esta se agrega sobre 0,6 mL de amortiguador pH 6 contenido en un tubo Eppendorf que se centrifuga durante 8 min a 13.000 rpm. Se extrae una alícuota de 50 µL del sobrenadante que se deposita en uno de las cubetas de una placa de 96 cubetas, y se lee la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (SpectraCount™ Packard A).

---

<sup>1</sup> Inicialmente se pensó en elaborar una gráfica que relacionara peso de cochinilla fresca vs. peso de cochinilla seca; de ese modo sería posible por simple extrapolación determinar el peso seco de cualquier cochinilla fresca que se hubiese analizado. Sin embargo, el contenido de agua de las cochinillas resultó muy variable. Por esa razón, todas y cada una de las cochinillas fueron secadas previamente a los análisis.

En cada placa se incluyen seis estándares con distintas concentraciones de ácido carmínico (Sigma Chemical Co., 90% de pureza), dos blancos con solución amortiguadora y un número variable de las muestras que se desea leer. Los valores de concentración de ácido carmínico en las muestras se interpolan de una recta de calibración hecha con los estándares, luego de restar de las absorbancias leídas el promedio de las absorbancias de los blancos. La concentración de ácido carmínico es expresada en función del peso seco de la muestra.

### **Influencia de factores genéticos sobre la CAC**

Se utilizaron tres diseños diferentes para los experimentos de cruces.

#### ***Cruces entre cochinillas criadas sobre trozos de cladodios en el laboratorio***

La primera aproximación al experimento de cruces se realizó con cochinilla criada sobre trozos de cladodio en el laboratorio. Evidencia en la literatura sugería que este sustrato permitiría el desarrollo de al menos una generación de cochinilla (Hosking 1984, Sullivan 1990); sin embargo, aunque la supervivencia de poblaciones de insectos es posible, las condiciones resultaron poco adecuadas al evaluar el desempeño de cochinillas individuales. El experimento de selección inicial que conduciría a la estimación de los componentes de la herencia del ácido carmínico, constó de las siguientes etapas: i) recolección de hembras oviplenas en terreno y transporte al laboratorio, ii) análisis del contenido de colorante de las primeras hembras que ovipositaron, iii) selección de la descendencia, iv) cruces entre las líneas seleccionadas, y v) análisis del contenido de colorante de aquellas hembras que ovipositaron. Como se muestra en la sección III.5, por diversos motivos los resultados no fueron alentadores, y se optó por realizar los experimentos de cruces en los predios de Tunantes SA.

---

### ***Cruces entre cochinilla criadas sobre tunales en predios de Tunantes SA***

Un primer experimento de cruces en terreno fue montado en abril del 2000, y constó de las etapas siguientes: i) recolección de hembras oviplenas en terreno, ii) siembra de las hembras sobre plantas de tuna, mediante infestadores, iii) análisis del contenido de colorante de aquellas hembras que ovipositaron al cabo de cuatro días de ser sembradas, y iv) crianza de la descendencia.

Desafortunadamente, la anomalía en las condiciones climáticas que prevaleció durante el invierno del 2000 en la IV región y a las que se vió sometido el predio experimental (precipitaciones y vientos anormalmente intensos el 14/15 de mayo, 14/15/24/28 de junio y 21 de julio), provocaron la desaparición de la mayor parte de las cochinillas. De las 241 líneas remanentes con crías, sólo 59 tenían una CAC sobre 18% peso seco. De éstas, sólo cuatro produjeron cocones y de ninguno de éstos emergieron machos adultos. La mortalidad observada coincide con los estadios ninfales I y II, informados como los más susceptibles a la acción prolongada de la lluvia (Moran *et al.* 1987). Las condiciones invernales típicas del área de desarrollo del proyecto, han permitido la producción de cochinilla sin mayores dificultades, a lo largo de cerca de una década; sin embargo, en la presente temporada las condiciones ambientales anómalas generaron elevados niveles de mortalidad especialmente entre las colonias en establecimiento, situación que no fue ajena a los campos experimentales.

En vista de estos resultados, se decidió montar nuevamente un experimento semejante hacia fines de agosto del 2000, cuando se estimó que el tiempo se había estabilizado. La recolección de hembras oviplenas se realizó el 27 de agosto, la siembra de ellas en plantas de tuna entre el 28 y el 29 de agosto, y la recolección de las hembras para la determinación de la CAC, entre el 5 y 6 de setiembre. De las 2500 hembras sembradas inicialmente, se constató que 683 habían dejado descendencia al momento de recolectar las madres. Desafortunadamente, se produjo nuevamente una anomalía climática con fuertes vientos e intensas lluvias durante el 9 y 10 de setiembre. El

censo efectuado entre el 12 y el 13 de setiembre mostró que sólo subsistían unas 100 líneas con un número adecuado de crías; estas líneas resultaron insuficientes para continuar el experimento.

Posteriormente, se realizaron tres nuevos experimentos en el campo, en ninguno de los cuales se obtuvo resultados satisfactorios, por razones que se analizan en la sección III.5. En vista de la imposibilidad de responder a las preguntas genéticas con el tipo de experimento diseñado, se realizó el experimento genético bajo condiciones controladas que permitiría, en principio, la disminución en la mortalidad por causas ambientales, una mejor sincronización del desarrollo de las líneas de cochinilla seleccionadas y la obtención de valores de CAC comparables entre generaciones.

#### *Cruces entre cochinillas criadas sobre cladodios enraizados, en una cámara de ambiente controlado*

Para este estudio, un total de 36 maceteros con cladodios de tuna individuales de un año de edad que habían sido plantados con un mes de anterioridad fueron instalados en cámaras de ambiente controlado (Conviron™) (22,5°C; fotoperiodo con 16 horas de luz y 8 de oscuridad). Dichos cladodios se infestaron con 150 hembras ovíparas prontas a oviponer, colectadas en los campos de la empresa Los Tunantes SA, ubicados en Las Rojas (28 km al este de La Serena) y en Pelicana (33 km al este de La Serena), y se permitió que la progenie se cruzara libremente. De entre las hembras ovíparas prontas a ovipositar que se originaron de esos cruces, se escogieron 122 individuos que estuvieran suficientemente separados en cada cladodio de modo que pudieran ser aislados entre sí mediante cajitas de plástico transparente con un agujero cubierto con malla fina. Estas cochinillas constituyeron la generación de padres a utilizar en los cruces dirigidos. Una vez que estas hembras ovipusieron, fueron sacrificadas y sus CAC determinadas utilizando el método descrito anteriormente. La progenie de estas hembras se mantuvo aislada. Una vez que comenzaron

a producirse capullos (primera etapa distinguible en la formación de machos), ellos fueron separados del resto de la colonia en tubos Eppendorf, de modo de liberarlos, cuando se hubieran convertido en machos adultos, dentro de la cajita de hembras de líneas predeterminadas. Los cruzamientos se desarrollaron sin mayor inconveniente debido a la sincronía que se produjo en la maduración sexual de machos y hembras. Las hembras cruzadas se desarrollaron hasta el estado adulto y, una vez que hubieron ovipuesto, fueron sacrificadas para la determinación de su CAC e identificadas como generación F1. Se permitió que la progenie de cada cruce se cruzara entre sí libremente - pero aisladas de los otros cruces, y se determinó finalmente la CAC de las hembras ovíparas que nacieron de esos cruces, y que fueron designadas como generación F2. Al final del experimento, se contó con 74 líneas F2.

Se realizaron dos tipos de cruces entre las líneas parentales, aleatorios y recíprocos, en los que se cruzaron, respectivamente, hembras de cualquier línea con machos de cualquier línea distinta de la anterior, o hembras de una línea con el macho de otra contrastante en CAC y el macho de esta última con la hembra de la primera.

### **Influencia de factores bióticos sobre la CAC**

Cómo punto de partida, se exploró el potencial reproductivo de la cochinilla. Para ello se tomó una muestra aleatoria de 100 cochinillas ovíparas prontas a oviponer, de los campos de la empresa Los Tunantes SA. Se llevaron dichas cochinillas al laboratorio, y luego de secadas, se categorizaron de acuerdo a su peso seco. Se contabilizó el número total de huevos colocados por cada individuo y, finalizado el período de oviposición, se determinó la CAC de cada cochinilla usando el procedimiento ya descrito.

Dado que la cochinilla es mayormente comercializada por peso seco, se investigó la relación entre el peso de la madre y fecundidad, la relación entre el peso de la madre y la concentración de

ácido carmínico y finalmente la relación entre la fecundidad y ácido carmínico. Siendo el ácido carmínico un compuesto con función defensiva (Eisner *et al.* 1980), este análisis se realizó para investigar la existencia de un compromiso fisiológico entre la asignación de recursos a reproducción o a defensa.

Por otra parte, se evaluó la incidencia de diversos factores bióticos asociados a los tunales infestados con cochinillas, sobre la concentración de ácido carmínico. Durante marzo y agosto del 2002, se seleccionaron aleatoriamente 150 cochinillas en terreno, para cada una de las cuales se evaluaron factores que se consideraron guardan relación con lo habitualmente observado en los tunales de la IV Región de Chile destinados a la producción de cochinilla, *i.e.* la presencia de hongos sobre los cladodios y sobre las excretas de cochinilla, así como variables destinadas a evaluar calidad de hospedero y efectos densodependientes en el insecto.

Los índices de infección fúngica sobre los cladodios y sobre las excretas de cochinilla, así como la cobertura cérica sobre los cladodios se basaron en escalas de 1 a 4 en las que el primer valor representaba escasa o nula cobertura y el valor 4 representaba cobertura total. Para el caso del color, se confeccionó una escala cromática tomando como base la variabilidad presente en el predio, que permitió la clasificación de los cladodios en cuatro categorías del 1 al 4, en la que 1 representaba el verde intenso y 4 el amarillo pálido. La superficie del cladodio se evaluó en  $\text{cm}^2$ , midiendo el diámetro mayor y el diámetro menor del cladodio y aproximando la figura a una elipse. La densidad de insectos en torno a una cochinilla focal se evaluó contando el número de cochinillas adultas vivas en un círculo de 5 cm de radio centrado en la cochinilla focal. Finalmente, la edad del cladodio y de la planta fueron obtenidas de los registros mantenidos por la empresa Tunantes SA.

Una vez obtenidos los datos de campo, las cochinillas fueron separadas de la planta, secadas, la concentración de ácido carmínico en ellas cuantificada por el método descrito anteriormente, y los resultados analizados mediante regresiones múltiples.

## **Mantención y comparación de diferentes poblaciones de cochinilla**

Se mantuvieron separadamente dos poblaciones de cochinilla. La primera, mantenida en un sector relativamente aislado del predio Pelicana de Tunantes, se originó en aquellos cruces del experimento genético de marzo del 2001 entre líneas con CAC más altas. La segunda, mantenida en un invernadero en el predio de Santa María de Cutún de Tunantes SA, provino de la selección de 2400 líneas con alta CAC que se cruzaron libremente. Las CAC promedio de estas dos poblaciones fue comparada periódicamente con aquella de los predios en general, tomando cada vez muestras consistentes en 83 madres prontas a oviponer.

### **III.4 Actividades y tareas ejecutadas**

Se puso a punto un método para el análisis de ácido carmínico en hembras ovíparas de cochinilla. Se verificó que la CAC en los predios de Tunantes SA mostraban una gran variabilidad, y que las mayores CAC determinadas no difirieron grandemente del promedio de la población. Se realizaron experimentos de cruces dirigidos, primero sobre trozos de cladodio en el laboratorio, luego en el terreno, y posteriormente en cámaras de ambiente controlado en el laboratorio. Finalmente, se evaluó el efecto de diversos factores bióticos sobre la CAC.

### **III.5 Resultados del proyecto**

#### ***Optimización del método de análisis de la CAC***

La tabla I muestra los factores que fueron estudiados con el fin de optimizar el método, el rango estudiado de cada factor, y también el valor finalmente utilizado, este último en caracteres resaltados.

Tabla I. Factores examinados durante el desarrollo del método de análisis de ácido carmínico. Se destacan los valores utilizados en la versión final del método.

Variable	Unidad	Valores estudiados de la variable	Criterio de optimización
Tiempo entre colecta de la cochinilla y su puesta a secar	días	<0,5 - 2 - 4 - 6	mayor CAC
Tiempo de secado	horas	0 - 24 - 48 - 72	peso constante y mayor CAC
Temperatura de secado	°C	40 - 50 - 60	peso constante y mayor CAC
Tiempo de extracción de ceras	segundos	30 - 60 - 90	constancia de peso seco
Proceso de extracción del colorante		<ul style="list-style-type: none"> <li>• triturar con polvo de vidrio</li> <li>• <b>ultrasonicar</b></li> </ul>	mayor CAC
Separación del ácido carmínico		<ul style="list-style-type: none"> <li>• filtrar por lana de vidrio, papel o algodón</li> <li>• <b>centrifugar</b></li> </ul>	calidad de la separación y rapidez de la operación
Estabilidad de los extractos de ácido carmínico	horas	0 - 4 - 8 - 24	mayor CAC

### *Influencia de factores genéticos sobre la CAC*

A pesar de la importancia comercial de la cochinilla y su larga historia de asociación con el hombre, la producción de ácido carmínico no ha hecho uso de las posibilidades de mejoramiento genético del insecto (Rodríguez y Niemeyer 2001). La especie presenta haplodiploidía funcional (Brown y Nur 1964, Aquino 1990), con patrones de herencia diferentes a los usuales, los cuales influyen sobre la metodología para estimar la heredabilidad y los otros componentes de la herencia (Margolies 1993). Adicionalmente no es posible evaluar el contenido de ácido carmínico de las hembras sino una vez muertas, y los insectos machos no acumulan cantidades apreciables de colorante lo cual representa dificultades adicionales en el diseño.

El diseño que se adoptó *a priori* fue un sistema de cruces con hermanos y medios hermanos. Las cochinillas de la población base son hembras fertilizadas, con las que se infestan individualmente cladodios de tunas; la descendencia se ocupa en los cruzamientos, que se llaman líneas paternas ( $P_1$ ). Se escogen 50 líneas de machos al azar y 100 líneas de hembras. Cada macho es puesto en un cladodio con tres hembras hermanas, y al día siguiente es transferido a un segundo cladodio con tres hembras hermanas de otra línea. Una vez que las hembras fecundadas comienzan a ovipositar, son utilizadas para infestar nuevos cladodios individuales. Las hembras resultantes de apareamientos sin restricciones en esta generación ( $F_1$ ), una vez que se han apareado y han comenzado a ovipositar, son sacrificadas y su CAC determinada (4 hembras por cruzamiento.). Adicionalmente, se determina la CAC en las hembras  $P_1$ .

El análisis principal es un ANDEVA jerarquizado con tres niveles, cuya estructura es la siguiente:

Componente	Grados de libertad	Media cuadrada esperada
Entre machos	49	$\sigma_w^2 + 4 \sigma_h^2 + 12 \sigma_d^2 + 24 \sigma_s^2$
Entre líneas maternas (mismo padre)	50	$\sigma_w^2 + 4 \sigma_h^2 + 12 \sigma_d^2$
Entre hermanas (mismo padre)	200	$\sigma_w^2 + 4 \sigma_h^2$
Entre progenie de un cruzamiento	1100	$\sigma_w^2$

$$\sigma_T^2 = \sigma_w^2 + \sigma_h^2 + \sigma_d^2 + \sigma_s^2$$

Los componentes de la varianza estiman los siguientes componentes de la variabilidad del carácter:

Componente	Covarianza	$V_A$	$V_D$	$V_{AA}$	$V_{AD}$	$V_{DD}$	$V_{AAA}$	$V_M$	$V_E$
$\sigma_s^2$	$\sigma_{HS}^2$	1/2	0	1/4	0	0	1/8	0	0
$\sigma_D^2$	$\sigma_{FS}^2 - \sigma_{HS}^2$	1/4	1/2	5/16	3/8	1/4	19/64	0	0
$\sigma_H^2$	$\sigma_{HERMANAS}^2 - \sigma_{TS}^2$	1/8	1/8	23/256	47/128	39/64	--	1	0
$\sigma_w^2$	$\sigma_T^2 - \sigma_{HERMANAS}^2$	5/16	5/8	135/256	95/128	55/64	--	0	1

donde T=total, FS=hermanos completos, HS=medios hermanos, M=efectos maternos, y E=efectos ambientales; A=efectos aditivos, D=efectos de dominancia, AA=interacción aditivo-aditivo.

Suponiendo que las interacciones aditivas son de poca importancia, se ocupar el componente  $\sigma^2_S$  para estimar la heredabilidad,  $h^2 = \sigma^2_S / \sigma^2_T$ . El componente  $\sigma^2_{H1}$  estima una parte pequeña de la varianza aditiva y de dominancia, aunque incluye una buena fracción de los componentes de interacción, y todos los efectos maternos, por lo que su valor permite estimar la importancia de estos últimos factores. La regresión entre madres e hijos (utilizando una de las 3 hermanas de cada línea) entrega una estimación del mismo componente  $\sigma^2_S$ , que se ocupa para una segunda estimación de la heredabilidad. Estas estimaciones están sesgadas si la interacción aditiva tiene importancia.

La primera aproximación al experimento de cruces se realizó con cochinilla criada sobre trozos de cladodio en el laboratorio. A continuación se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos de tres cruces.

#### Cruce 41

Línea de macho	CAC (% peso seco) de la madre del macho	Líneas de hembra	CAC (% peso seco) de la madre de las hembras	Peso seco (mg) de la madre de las hembras	CAC (% peso seco) de las hembras cruzadas	Peso seco (mg) de las hembras cruzadas
1419	19,2	1425	20,1	np	np	np
1419	19,2	1433	22,3	np	np	np
1419	19,2	1427 1427	19,5 19,5	10,8 10,8	4,1 25,1	5,1 5,0

#### Cruce 61

Línea de macho	CAC (% peso seco) de la madre del macho	Líneas de hembra	CAC (% peso seco) de la madre de las hembras	Peso seco (mg) de la madre de las hembras	CAC (% peso seco) de las hembras cruzadas	Peso seco (mg) de las hembras cruzadas
1188	20,8	837	20,1	11,4	13,9	7,6
1188	20,8	1419	19,2	10,0	21,1	3,9
1188	20,8	1054	27,7	np	np	np

**Cruce 89**

Línea de macho	CAC (% peso seco) de la madre del macho	Líneas de hembra	CAC (% peso seco) de la madre de las hembras	Peso seco (mg) de la madre de las hembras	CAC (% peso seco) de las hembras cruzadas	Peso seco (mg) de las hembras cruzadas
943	20,7	1371	22,1	10,0	14,0	3,8
943	20,7	1353	22,0	np	np	np
943	20,7	1327	22,7	7,6	14,7	7,0

np= cruce no productivo.

El cruce 41 muestra que un mismo macho cruzado con dos hermanas generó progenie con pesos bajos pero semejantes, y CAC muy diferentes. Los cruces 61 y 89 muestran la generación de progenie con pesos y CAC bajos y erráticos.

La Tabla 2 muestra que tanto la CAC como el peso promedio de las cochinillas criadas en el laboratorio fueron menores y sus varianzas mayores, que aquellos de las cochinillas provenientes del campo.

Tabla 2. Comparación de CAC y peso seco de cochinillas provenientes del campo y criadas en el laboratorio.

	CAC (% peso seco)	Peso seco (mg)
Madres provenientes del campo (n=1000)	16,5 ± 0,34	11,5 ± 0,14
Crias cruzadas que tuvieron descendencia (n=57)	13,5 ± 0,49	5,4 ± 0,23

Esta situación fue atribuida a la mala calidad del sustrato donde se desarrollaron las cochinillas (pequeños trozos de cladodio) y a las condiciones de crianza en el laboratorio (condiciones de luz, temperatura y fotoperiodo subóptimos).

En consecuencia, se decidió realizar los experimentos de cruces en el campo. Después de varios intentos, el análisis cuidadoso de las condiciones en que fueron realizados los experimentos señaló las siguientes fuentes de problemas, y las soluciones adoptadas:

1. *Calidad del infestador.* El infestador original utilizado fue diseñado para infestaciones orientadas hacia la producción masiva. Se diseñó un nuevo infestador adecuado a la infestación por tan sólo una hembra por cladodio de tuna. Esta hembra fue ubicada en una gasa adherida al cladodio de modo tal que ella estuvo en contacto con la superficie de la planta, aumentando la probabilidad de fijación de las crías.
2. *Condiciones climáticas.* Es frecuente el desalojamiento de las crías por factores ambientales tales como rocío, viento, y lluvia. Se diseñó una caja de protección de plástico con agujeros sellados con tul fino, con la cual se cubrió la naciente colonia de insectos. Además, se protegieron las poblaciones experimentales durante períodos críticos mediante el empleo temporal de coberturas zonales.
3. *Material inicial.* La selección de hembras, inicialmente efectuada sobre la base de su volumen. Con el objeto de sincronizar mejor la generación de hijas, se seleccionó hembras que en el momento de la infestación estaban oviponiendo.
4. *Traslado de cocones.* Debido a que algunos cocones fueron trasladados cuando aún estaban inmaduros, posiblemente provocando daño a la pupa en su interior, se optó por vigilar más de cerca el experimento de modo de trasladar los cocones sólo cuando los machos adultos estuvieron prontos a emerger.
5. *Ciclo de vida.* La duración del ciclo de vida de la cochinilla resultó notablemente distinto de aquella publicada en la literatura. Posiblemente esto se deba a la manipulación de que son objeto los insectos tanto durante la infestación como durante los cruces. En consecuencia, se minimizó las manipulación de los insectos.

Después de tomar todas las medidas correctivas descritas, la sobrevivencia de las cochinillas fue notablemente superior, la progenie estuvo mejor sincronizada, y el número de cruces al final de los experimentos aumentó con respecto a los primeros experimentos. Sin embargo, este número nunca logró ser suficiente como para obtener resultados confiables (ver la tabla 3). Esto se debió a que en los experimentos de cruces, las CAC de las madres no son estrictamente comparables con las de las hijas ya que ambas generaciones se desarrollaron en ambientes muy distintos y la CAC resulta ser marcadamente dependiente de la estación del año. En efecto, las primeras madres que fueron seleccionadas para cruzar se desarrollaron en condiciones de otoño y las últimas, en condiciones de invierno; por otra parte, las primeras hijas producto de los cruces se desarrollaron en condiciones de invierno y las últimas en condiciones de primavera. Adicionalmente, tampoco son estrictamente comparables entre sí los distintos cruces ya que, dadas las condiciones de los experimentos de campo, es inevitable que se produzcan desfases entre los distintos cruces.

Tabla 3. Resultados globales de los experimentos realizados en el campo.

<b>Etapa</b>	<b>IV-2000</b>	<b>VIII-2000</b>	<b>IX-2000</b>	<b>III-2001</b>
Selección inicial	2500	2500	4000	500
Hembras que ovipusieron en cantidad suficiente	1000	683	900	371
Líneas con machos viables	4	100	120	193
Cruces realizados	0	0	60	165
Cruces al final del experimento	0	0	11	32

En vista de la imposibilidad de responder a las preguntas genéticas con el tipo de experimento diseñado, se decidió realizar los experimentos de cruces sobre cladodios enraizados que crecían en una cámara de ambiente controlado en el laboratorio.

En estos experimentos se realizaron dos tipos de cruces, aleatorios y recíprocos, con el objeto de determinar la heredabilidad del ácido carmínico y también la eventual existencia de herencia no genética materna. En los primeros, se cruzó hembras de cualquier línea con machos de

cualquier línea distinta de la anterior. En los segundos, se cruzó la hembra de una línea con el macho de otra, y el macho de esta última con la hembra de la primera, tratando en lo posible que las líneas cruzadas tuvieran CAC contrastantes. Se obtuvieron 54 cruces aleatorios y 10 cruces recíprocos.

El resultado de los cruces aleatorios se muestra en la Figura 1. Esta muestra que los valores de la CAC de la generación parental no correlacionan con los de la F1. Sin embargo, los valores de la generaciones sucesivas criadas en la cámara mostraron valores de CAC promedio crecientes (Figura 2).

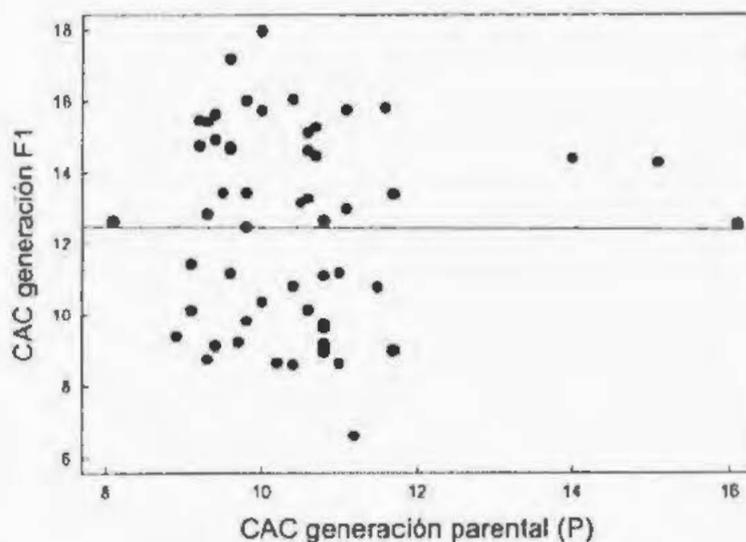


Figura 1. Resultado de cruces aleatorios con cochinilla criada en una cámara de ambiente controlado.

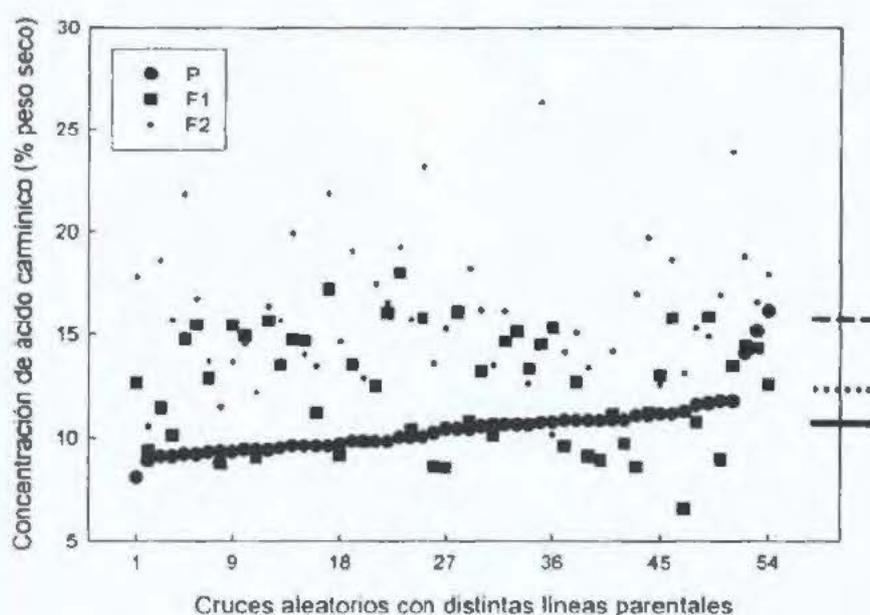


Figura 2. Valores de la CAC para líneas parentales, F1 y F2 productos de cruces realizados en una cámara de ambiente controlado (P=línea continua; F1=cruces; F2= línea discontinua).

La figura 3 muestra los resultados de los cruces recíprocos. El promedio de los cruces de hembras con valores de CAC altos con machos con CAC bajos, fue levemente mayor que sus cruces recíprocos tanto en la generación F1 como en la generación F2 (13.04 vs. 12.06 y 16.53 vs. 14.57, respectivamente). Aunque las comparaciones no resultaron significativas (prueba de signos con rangos de Wilcoxon,  $P > 0.4$ ), las tendencias permiten sugerir un efecto materno no genético pues si la herencia fuera únicamente del tipo haplodiploide funcional, con heterocromatización de los cromosomas paternos, se esperaría que a partir de líneas de madres con altas CAC se obtuviera progenie con alta CAC, y a partir de líneas de madres con baja CAC se obtuviera progenie con baja CAC, lo cual no ocurre.

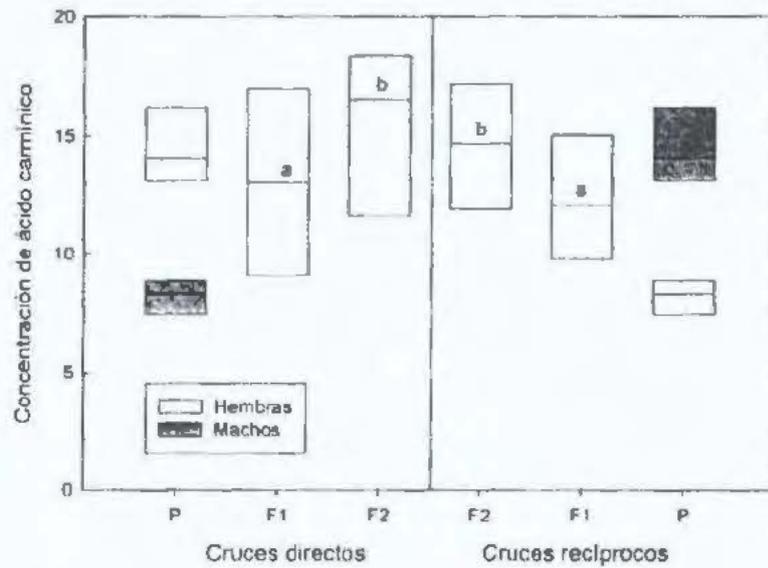


Figura 3. Resultados de cruces recíprocos con cochinilla criada en una cámara de ambiente controlado.

#### *Existencia de un compromiso entre reproducción y defensa en la cochinilla*

Los resultados del análisis de regresión muestran una relación directa significativa ( $R^2 = 0,97$ ;  $p < 0,002$ ) entre el peso promedio de las cochinillas y el número de huevos que estas oviponen (Figura 4-A). Por otra parte, los resultados del análisis de regresión entre el peso promedio y la CAC muestran una relación inversa significativa ( $R^2 = -0,94$ ;  $p < 0,0057$ ) entre las variables (Figura 4-B). Sobre la base de estos resultados, se realizó un análisis de regresión entre las variables CAC y número de huevos, el que muestra una relación inversa significativa ( $R^2 = -0,90$ ;  $p < 0,01$ ), confirmando la existencia de un compromiso entre la asignación de recursos a defensa y reproducción (Figura 4-C).

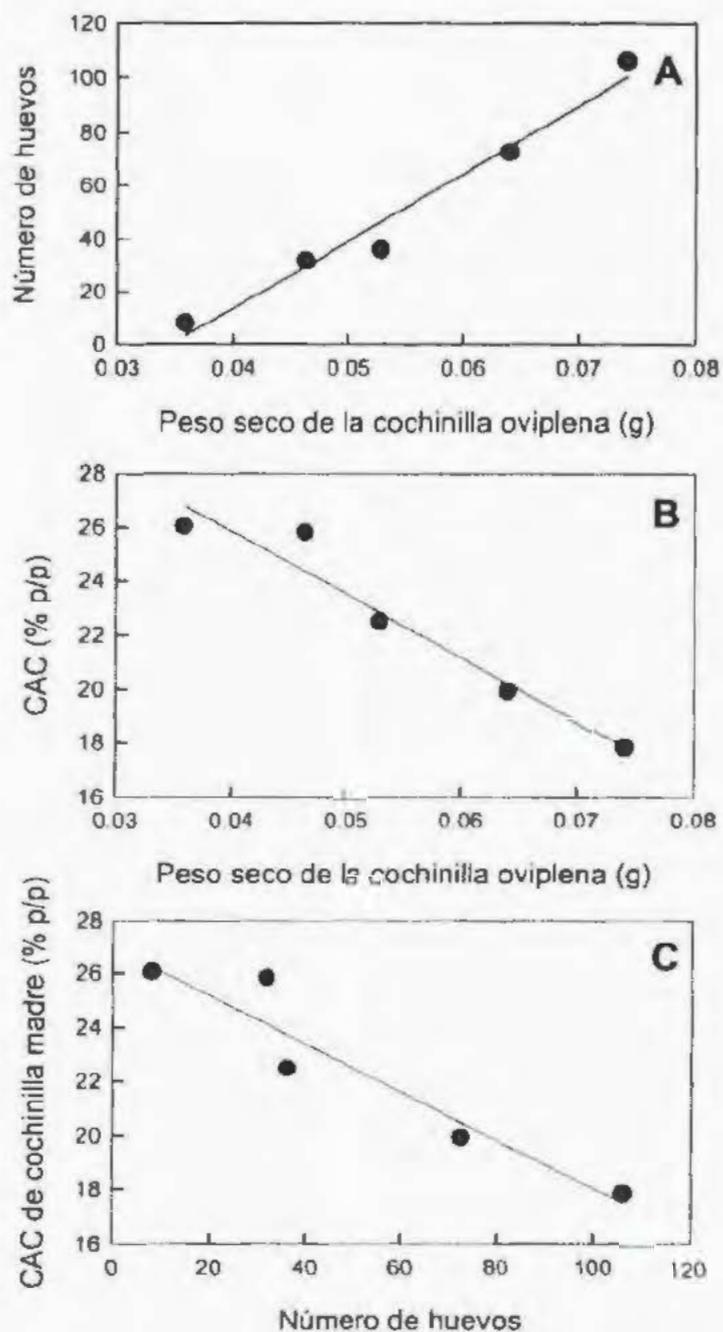


Figura 4. Relaciones entre número de huevos puestos por una hembra de cochinilla, y su peso seco y concentración de ácido carmínico.

### ***Influencia de factores bióticos sobre la CAC***

La tabla 4 resume los resultados del análisis de regresión lineal de los datos obtenidos. A continuación se comentan aquellas variables cuyos efectos sobre la CAC resultaron estadísticamente significativos.

Tabla 4. Resumen de los resultados del análisis por regresión lineal múltiple de los datos obtenidos de los experimentos realizados para evaluar los efectos de factores bióticos sobre la concentración de ácido carmínico, en dos temporadas.  $R^2 = 0.16$ ,  $P < 0.05 = *$ ,  $P < 0.01 = **$ .

<b>Variable estudiada</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Error estándar</b>
Constante	2.359**	0.176
Estación	0.134**	0.031
Infección fúngica sobre los cladodios	-0.014	0.013
Cobertura cérica sobre el cladodio	-0.032	0.018
Densidad en torno a cochinilla focal	0.055**	0.017
Superficie del cladodio	0.033	0.023
Infección fúngica sobre excretas de cochinilla	0.029	0.017
Color del cladodio	-0.051**	0.015
Edad del cladodio	-0.069*	0.037
Edad de la planta	0.068*	0.036

La tabla señala la importancia del componente estacional sobre la CAC (16,9% en marzo 2003 y 19,1% en agosto 2003,  $p < 0,01$ ). Dicha variación estacional probablemente está asociada a las condiciones de estrés hídrico de la planta durante el verano debido al incremento de la temperatura y la disminución en las precipitaciones. Este efecto es más evidente debido a que los bajos precios de la cochinilla en los últimos años han generado problemas económicos reflejados en la disminución de la periodicidad del riego en el predio.

La densidad de cochinillas en el cladodio aumentó la CAC, sugiriendo que al incrementarse los niveles de infestación ocurren respuestas densodependientes que se traducen en cochinillas con

menor tamaño corporal y menor potencial reproductivo, resultados de la competencia intraespecífica. Como se describió más arriba, la CAC está inversamente relacionada con el tamaño corporal.

El color del cladodio resultó una variable significativa que puede estar relacionada con el estado nutricional de la planta, pues plantas cloróticas hospedan cochinillas con menor CAC.

La edad del cladodio afectó negativamente la CAC. Estudios de fisiología vegetal en la tuna evidencian cambios en la asignación de recursos entre cladodios de diferentes edades, lo que podría afectar la calidad de los mismos para el insecto (Inglese *et al.* 1999).

La edad de la planta influyó positivamente sobre la CAC. Entre las prácticas agrícolas habituales, las plantas de tuna son regularmente podadas en su parte aérea, alterándose el tamaño de la canopia y el número de cladodios; sin embargo, el sistema radicular no es modificado por la poda. En consecuencia, una planta de mayor edad presentaría una mayor capacidad de absorción de agua y nutrientes que una de menor edad, lo cual beneficiaría positivamente al insecto al tener un hospedero de mayor calidad.

La tabla 4 muestra que los efectos fúngicos sobre cladodios y cochinilla no son significativos al ser analizados a lo largo del año. Sin embargo, en Chile las infecciones fúngicas sobre los frutales son más importantes durante los meses de primavera-verano debido al incremento de la temperatura ambiental (Razeto 1999). Debido a ello, no es sorprendente que sólo durante esos meses, el efecto sobre la CAC de las infecciones fúngicas en la superficie de los cladodios de tuna y en las excretas de cochinilla, sean marginalmente significativos,  $P= 0.065$  y  $P= 0.061$ , respectivamente. Las infecciones sobre los cladodios tienen un efecto negativo sobre la CAC, al disminuir la superficie fotosintética de la planta o alterar su metabolismo, mientras que las infecciones fúngicas sobre excretas de cochinilla tienen efecto positivo sobre la CAC, sugiriendo

que niveles moderados de estrés derivados del ambiente o de interacciones biológicas podrían gatillar mecanismos defensivos que incluyen incremento de las defensas químicas.

Los resultados sugieren que podrían ser implementadas medidas de manejo con el propósito de que la cochinilla acumule concentraciones mayores de ácido carmínico. Adicionalmente, el bajo valor de ajuste de la regresión entre factores bióticos y CAC sugiere que factores ambientales como temperatura y fotoperiodo, y prácticas culturales como riego y fertilización, podrían tener un mayor efecto sobre la CAC que las interacciones biológicas evaluadas.

### ***Comparación de la CAC entre tres poblaciones de cochinilla***

La figura 5 muestra la variación de los valores promedio de CAC en tres poblaciones de cochinilla: una, mantenida en el predio de Pelicana que se originó en cruces entre líneas con CAC altas; otra, mantenida en un invernadero en el predio de Santa María de Cutún de Tunantes SA, que provino de la selección de líneas con alta CAC que se cruzaron libremente; y la última una muestra representativa de los predios en general. Se constató que los promedios de los sectores con cochinilla seleccionada (Pelicana:  $17.89 \pm 3.56$ ; Cutún:  $16.69 \pm 2.72$ ) no difieren de aquellos del predio en general ( $16.96 \pm 3.78$ ) (ANDEVA de Friedman:  $df = 2$ ; coeficiente de concordancia de Kendall = 0.0000;  $p = 1$ ), y que los valores exhiben leves variaciones correspondientes a las estaciones cuando se realizaron los muestreos, i.e. en los muestreos de invierno la CAC tendió a ser alta, en tanto en los muestreos de verano tendió a ser baja. Esto sugiere que se podría conseguir una mayor CAC mediante prácticas culturales que amortigüen los efectos estacionales.

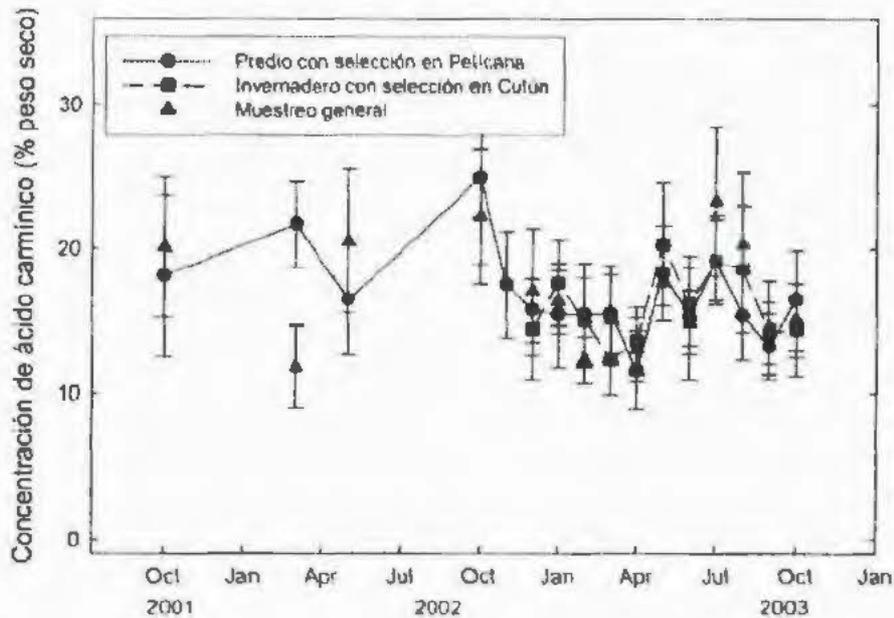


Figura 5. Comparación de la CAC de tres poblaciones de cochinilla.

### III.6 Perspectivas futuras

Se considera que, a pesar de las dificultades experimentadas durante su desarrollo y la escasa información disponible en su comienzo acerca del funcionamiento del sistema, el proyecto ha sido razonablemente exitoso. No sólo se han conseguido evidencias que sugieren prácticas culturales que pudieran aumentar la CAC, sino que se han creado las condiciones para que el número de personas dedicadas a la crianza de cochinilla en el valle del Elqui pueda experimentar un notable incremento, particularmente entre aquellas poseedoras de predios con pequeñas superficies. Se está presentando en conjunto con este informe final, un proyecto de consolidación con el objeto de difundir la crianza de cochinilla entre los pequeños agricultores del valle, hacer los estudios socioeconómicos necesarios y producir los paquetes tecnológicos que permitan implementar las nuevas explotaciones.

### III.7 Problemas enfrentados

Se llevó a cabo un primer experimento de cruces con cochinilla criada sobre trozos de cladodio en el laboratorio. Este experimento de cruces generó resultados anómalos: i) un mismo macho cruzado con dos hermanas generó progenie con pesos bajos pero semejantes, y CAC muy diferentes; ii) otros cruces mostraron que tanto los pesos como la CAC de la progenie eran bajos y erráticos, y iii) el peso promedio de las cochinillas criadas en el laboratorio fueron menores y sus varianzas mayores, que aquellos de las cochinillas provenientes del campo.

Esta situación fue atribuida a la mala calidad del sustrato donde se desarrollaron las cochinillas (pequeños trozos de cladodio) y a las condiciones de crianza en el laboratorio (condiciones de luz, temperatura y fotoperíodo subóptimos). En vista de estos resultados, se decidió realizar todos los experimentos en el campo, utilizando para ello predios de Los Tunantes SA.

Desafortunadamente, la anomalía en las condiciones climáticas que prevalecieron durante el invierno y primavera del 2000, no permitió que los experimentos llegaran a buen término. Adicionalmente, en el experimento que llegó a término con un número razonable de cruces se demostró que los valores de CAC eran erráticos debido a desfasaje entre líneas y a condiciones de crianza distintas para las distintas generaciones estudiadas. En consecuencia, se decidió realizar los experimentos de cruces en cámaras de ambiente controlado en el laboratorio.

El resultado de los experimentos realizados en la cámara de ambiente controlado tampoco fue satisfactorio. Por razones de espacio no pudo iniciarse el experimento con un número suficientemente grande de líneas de cochinilla. Además, se observó mortalidad más alta de lo esperado, y los resultados fueron nuevamente distintos a lo predicho.

### III.8 Calendario de ejecución

Tomando en cuenta los factores adversos experimentados, se logró readecuar la programación del proyecto para satisfacer la mayor parte de los objetivos planteados originalmente.

El cuadro siguiente muestra el resumen de los costos del proyecto:

Item de gasto	Financiamiento solicitado	Financiamiento real
Recursos humanos	60.304.587	60.364.484
Insumos	13.238.566	12.720.644
Viajes	5.971.687	6.821.843
Servicios de terceros	909.650	965.213
Actividades de transferencia	250.000	619.539
Gastos generales y administración	7.746.440	6.929.207
<b>Total</b>	<b>88.420.930</b>	<b>88.420.930</b>

### III.9 Difusión de los resultados

Periodistas de Bioplanet entrevistaron a miembros del equipo de trabajo. La entrevista fue publicada en: Anónimo (2000) Mejoramiento genético: el rojo tesoro de la cochinilla. **Bioplanet** 6: 10-13.

Se organizó la visita durante el mes de diciembre del 2000 del Dr. John Hoffman, del CSIR en Sudáfrica, quien tiene experiencia en cochinilla y está interesado en establecer contactos con investigadores en el área. El Dr. Hoffman participó en una mesa redonda en el FIA que giró en torno a control biológico de plagas, y dió una conferencia en la Facultad de Ciencias de la

Universidad de Chile, donde presentó resultados de sus experiencias de cruces con *Dactylopius opuntiae*, utilizada en el control de dos especies de *Opuntia*.

Por último, se realizó en diciembre del 2003 una reunión con representantes del FIA, ejecutores del proyecto y empresarios dedicados a la producción de cochinilla, en la que se expuso los resultados del proyecto y se examinaron posibles proyecciones de éste.

### Publicaciones

Las siguientes publicaciones fueron posibles en parte gracias al apoyo brindado por el FIA a través del presente proyecto:

1. Rodríguez, L.C. & Niemeyer, H.M. (2000) Evidencias indirectas sobre el origen de la cochinilla, *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae). **Revista Chilena de Entomología** 27: 85-89.
2. Rodríguez, L.C., Méndez, M.A. & Niemeyer, H.M. (2001) Direction of dispersion of cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) within the Americas. **Antiquity** 75: 73-77.
3. Rodríguez, L.C. & Niemeyer, H.M. (2001) Cochineal production: a pre-Columbian industry that revives. **Athena Review** 2: 76-78.
4. Rodríguez, L.C., Pascual, U. & Niemeyer, H.M. (2003) Local identification and valuation of ecosystem goods and services from *Opuntia* scrublands of Ayacucho, Peru. **Ecological Economics**, enviado.
5. Rodríguez, L.C., Pascual, U. & Niemeyer, H.M. (2003) Social capital and *Opuntia* scrubland habilitation in Ayacucho, Peru. **Economic Development and Cultural Change**, enviado.
6. Rodríguez, L.C., Marín, V. & Niemeyer, H.M. (2003) Social capital, land use change and peasants' income: a model of *Opuntia* scrublands in Ayacucho, Peru. **Ecological Modelling**, enviado.
7. Rodríguez, L.C., Faúndez, E., Seymour, J., Escobar, C.A., Espinoza, L., Petroutsa, M. & Niemeyer, H.M. (2003) Concentración de ácido carmínico en la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) (Homoptera: Dactylopiidae). **Agricultura Técnica (Chile)**, enviado.

### III.10 Impacto del proyecto

Aunque los resultados del proyecto sugieren que algunas prácticas culturales en la crianza de cochinilla permitirían incrementar levemente la concentración de ácido carmínico (CAC)

acumulado por ellas, por los motivos expuestos en el cuerpo principal de este informe no se logró el objetivo general del proyecto, cual era de conseguir un aumento considerable de la CAC. Los experimentos realizados han permitido tomar conciencia del enorme esfuerzo en investigación básica que será necesario para entender cabalmente el sistema hasta el punto de poder manejarlo para obtener beneficios considerablemente mayores a los que se obtienen actualmente.

Un resultado con gran potencial futuro es el efecto catalizador que significó la ejecución del proyecto y la difusión de sus resultados hacia una eventual consolidación como grupo cohesionado de los empresarios que crían cochinilla. Se prevé que en un futuro próximo este grupo promueva la diseminación de la crianza de cochinilla a otros predios en el valle del Elqui, particularmente hacia campesinos con predios relativamente pequeños. El efecto social de esta medida podría ser enorme.

Sobre la base de los resultados del proyecto, se presentó al FIA un proyecto de consolidación con el objeto de promover la crianza de cochinilla entre los pequeños agricultores del valle, evaluar los determinantes de su disposición a incorporarse a la nueva actividad, así como sus características socio-económicas, de forma de elaborar paquetes tecnológicos adecuados a su condición.

### **III.11 Conclusiones y recomendaciones**

El funcionamiento del sistema tuna-cochinilla-ácido carmínico ha sido escasamente estudiado y la comprensión que de él se tiene es incompleta. Los resultados de este proyecto señalan posibles vías para lograr mayor rendimiento del sistema en términos de concentración de ácido carmínico acumulado por la cochinilla, y para lograr que un mayor número de personas, en particular campesinos con pequeños predios en el valle de Elqui, tengan acceso a paquetes tecnológicos simples que les permitan criar cochinilla en condiciones ventajosas. Esta posibilidad deberá ser estudiada; se propone hacerlo a través de un proyecto de consolidación.

### III.12 Otros aspectos de interés

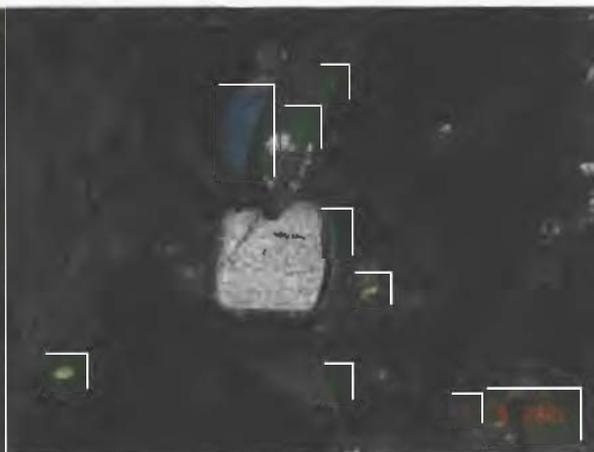
El Sr. Luis Carlos Rodríguez participó como entomólogo en el proyecto. Enrolado en el programa de doctorado en Ecología y Biología Evolutiva de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, el Sr. Rodríguez desarrolló su línea de investigación en el área de economía ecológica. Al término del proyecto, el Sr. Rodríguez había entregado su tesis doctoral: “Valoración de servicios ecosistémicos y cambio en el uso del suelo, la importancia del capital social en los Andes peruanos”, teniendo como sistemas de estudio los tunales y la cochinilla.

### III.13 Anexos

A continuación se exponen algunas fotografías que muestran aspectos del proceso de crianza de cochinilla y de experimentación con ella.



Paleta de tuna con alto grado de infestación por cochinilla



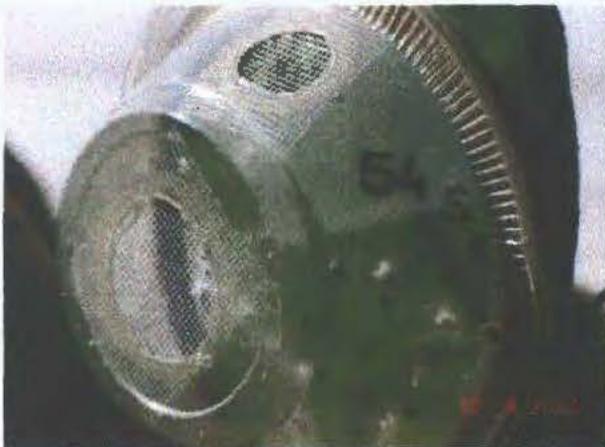
Colecta de cochinilla



Daño causado por caracoles



Necrosis causada por infección fúngica



Sistema para aislar cruces dirigidos



Experimento en progreso



Aspecto general de la zona protegida con cochinilla mejorada



Aspecto actual de una zona del predio



Invernadero con cochinilla seleccionada

Judith Seymour, investigadora encargada de los experimentos de campo, y Loreto Burgos, supervisora del proyecto

### III.14 Bibliografía consultada

- Aquino, G. 1990. Estudio cromosómico de cuatro tipos de cochinilla (*Dactylopius* spp.) (Homoptera : Dactylopiidae) del nopal: Colegio de Posgraduados 1991. Tesis de Maestría en Ciencias en Fruticultura.
- Brown, S.W. y Nur, U. 1964. Heterochromatic chromosomes in the coccids. *Science* 145: 130-136.
- Eisner, T., Nowicky S., M. Goetz., y Meinwald, J. 1980. Red cochineal dye (carminic acid): its role in nature. *Science* 208: 1039-1042.
- Flores-Flores, V. y Tekelenburg, A. 1995. Agro-Ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear. FAO Plant Production and Protection paper 132.
- González, M., Méndez, J., Carnero, A., Lobo, M.G., y Alfonso, A. 2002. Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6968-6974.
- Hosking, J.R. (1984) The effect of temperature on the population growth potential of *Dactylopius austrinus* De Lotto (Homoptera: Dactylopiidae), on *Opuntia aurantica* Lindley. *Journal of the Australian Entomological Society* 23: 133-139.

- Inglese, P., Barbera, G. y La Mantia, T. 1999. Seasonal reproductive and vegetative growth patterns and resource allocation during cactus pear fruit growth. *Hortscience* 34 : 69-72.
- Margolies, D.C. 1993. Quantitative genetics applied to haplodiploid insects and mites. En: *Evolution and Diversity of Sex Ratio in Insects and Mites*. Wrensch, D.L. & M.A. Ebbert, eds. Chapman & Hall, Inc., Nueva York.
- Moran, V.C., Hoffmann, J.H. & Basson, N.C.J. (1987) The effects of simulated rainfall on cochineal insects (Homoptera: Dactylopiidae): colony composition and survival on cactus cladodes. *Ecological Entomology* 12: 51-60.
- PRA 2002. El mercado de la cochinilla. Proyecto PRA. Centro de Servicios Económicos Ayacucho. Ayacucho.
- Razeto, B. 1999. *Fruticultura-Chile*, Vértigo, Santiago.
- Rodríguez, L.C. y Niemeyer, H.M. 2001. Cochineal production: a reviving Precolumbian industry. *Athena Review* 2: 76-78.
- Rodríguez, L.C., Méndez, M.A. y Niemeyer, H.M. 2001. Direction of dispersion of cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) within the Americas. *Antiquity* 75: 73-77.
- Sullivan, P.R. (1990) population growth potential of *Dactylopius ceylonicus* Green (Hemiptera: Dactylopiidae) on *Opuntia vulgaris* Miller. *Journal of the Australian Entomological Society* 29: 123-129.