GOBIERNO DE CHILE
INIA - QUILAMAPU

INFORME TECNICO FINAL

CONTROL BIOLÓGICO DEL CABRITO DE LOS FRUTALES (*Aegorhinus superciliosus*) MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATOGENOS NATIVOS

FUNDACION PARA LA INNOVACION AGRARIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACION QUILAMAPU

Chillán, Chile, Marzo de 2004

INFORME TECNICO FINAL

CONTROL BIOLÓGICO DEL CABRITO DE LOS FRUTALES (*Aegorhinus superciliosus*) MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATOGENOS NATIVOS

FUNDACION PARA LA INNOVACION AGRARIA

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACION QUILAMAPU

Chillán, Chile, Marzo de 2004

INDICE Página

I. ANTECEDENTES GENERALES 5

II. RESUMEN EJECUTIVO 6

III. TEXTO PRINCIPAL 7

1. RESUMEN DE LA PROPUESTA 7

2. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO 9

3. ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL PROYECTO 11
3.1. Selección del mejor aislamiento de nemátodos 11
3.2. Capacidad de profundización del nemátodo 12
3.3. Establecimiento de ensayo en terreno. Aplicaciones de verano 12
3.4. Establecimiento de ensayo en terreno. Aplicaciones de invierno 13
3.5. Crianza artificial de cabritos 14
3.6. Evaluación de hongos entomopatógenos 14
3.7. Ensayos en terreno con hongos entomopatógenos 15
3.8. Ensayos en maceta con nemátodos 15
3.9. Ensayos en terreno con nemátodos. Persistencia en el suelo 16
3.10. Ensayos en terreno con nemátodos. Efectividad del control de cabritos 17
3.11. Efecto de los hongos entomopatógenos en adultos de cabritos 17

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS 19
4.1. Colecta de larvas y adultos de *A. Superciliosus* 19
4.2. Crianza de *A. superciliosus* 19
4.3. Multiplicación de nemátodos entomopatógenos 19
4.4. Evaluación y selección de la colección INIA de nemátodos entomopatógenos 19
4.5. Pruebas de dosis y tiempo letal 19
4.6. Pruebas de efectividad los nemátodos entomopatógenos 20
4.7. Elaboración de una preparación comercial capaz de proteger a los nemátodos contra la desecación y la radiación ultravioleta 20
4.8. Aplicación y dosificación de campo 20
4.9. Actividades de transferencia 20

5. RESULTADOS DEL PROYECTO 21
5.1. Selección del mejor aislamiento de nemátodos 21
5.2. Capacidad de profundización del nemátodo 22
5.3. Establecimiento de ensayo en terreno. Aplicaciones de verano 23
5.4. Establecimiento de ensayo en terreno. Aplicaciones de invierno 24
5.5. Crianza artificial de cabritos 25
5.6. Evaluación de hongos entomopatógenos 27
5.7. Ensayos en terreno con hongos entomopatógenos 28
5.7.1. Evaluación del hongo *Beauveria* 28

5.7.2. Evaluación del hongo *Metarhizium* 29
5.8. Ensayos en maceta con nemátodos 30
5.9. Ensayos en terreno con nemátodos. Persistencia en el suelo 33
5.9.1. Huerto Villarrica 33
5.9.2. Huerto de Purranque 34
5.9.3. Huerto Freire 35
5.10. Ensayos en terreno con nemátodos. Efectividad del control de cabritos 36
5.10.1. Huerto de Freire 36
5.10.2. Huerto de Villarrica 37
5.10.3. Huerto de Purranque 38
5.10.4. Huerto de La Unión 39
5.11. Efecto de los hongos entomopatógenos en adultos de cabritos 40

6. FICHAS TÉCNICAS 43

7. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO 44

8. CALENDARIO DE EJECUCIÓN 45
8.1. Ejecución de actividades 45
8.2. Resumen de costos 46

9. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS 47

10. IMPACTOS DEL PROYECTO 48

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 49

12. OTROS ASPECTOS DE INTERÉS 51

13. ANEXOS 52

14. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA 64

INDICES DE CUADROS

Página

1. Ubicación de los lugares de colecta de nemátodos entomopatógenos 11
2. Esquema de tratamientos y frecuencia de aplicación de entomopatógenos 13
3. Huertos, ubicación y plagas bajo ensayo 17
4. Causa y porcentajes de mortalidad de larvas de cabritos bajo cultivo artificial 26
5. Captura de adultos, ovipostura y producción de larvas en cautiverio 26
6. Aislamiento, mortalidad y esporulación de distintos aislamientos 27
7. Lugares, fecha de aplicación y control de insectos con nemátodos 40
8. Comparación entre actividades programadas y ejecutadas 45
9. Resumen de aportes y gastos programados y reales 46

INDICE DE FIGURAS

Página

1. Mortalidad de larvas de *A. superciliosus* con diferentes aislamientos de nemátodos 21
2. Mortalidad de larvas de *A. superciliosus* a los 10 días de postinoculación 22
3. Mortalidad de larvas de *A. superciliosus* a través del tiempo 23
4. Regresión de aplicaciones de nemátodos sobre larvas de *G. mellonella* parasitadas. Aplicación de nemátodos en verano 24
5. Regresión de aplicaciones de nemátodos sobre larvas de *G. mellonella* parasitadas. Aplicación de nemátodos en invierno 25
6. Mortalidad y emisión de esporas en adultos de *A. superciliosus* 28
7. Respuesta del número de aplicaciones de *B. basssiana* en larvas *G. mellonella* 29
8. Regresión de aplicaciones de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* 30
9. Altura de arándanos infectadas con *O. sulcatus* e inoculadas con nemátodos 31
10. Área foliar de arándanos infectadas con *O. sulcatus* e inoculadas con nemátodos 31
11. Peso de raíces de arándanos con *O. sulcatus* e inoculadas con nemátodos 32
12. Daño de *O. sulcatus* en arándanos inoculadas con diferentes dosis de nemátodos 33
13. Mortalidad de *G. mellonella* de suelos tratados con nemátodos. Ensayo de Villarrica 34
14. Mortalidad de *G. mellonella* de suelos tratados con nemátodos. Ensayo de Purranque 35
15. Mortalidad de *G. mellonella* de suelos tratados con nemátodos. Ensayo de Freire 36
16. Emergencia de *A. cervinus* de arándanos tratados con nemátodos. Ensayo de Freire 37
17. Emergencia de *O. sulcatus* de arándanos tratados con nemátodos. Ensayo de Villarrica 38
18. Emergencia de *O. sulcatus* de arándanos tratados con nemátodos. Ensayo de Purranque 39
19. Emergencia de *O. sulcatus* de arándanos tratados con nemátodos. Ensayo de La Unión 40
20. Mortalidad de *A. superciliosus* tratados con hongos entomopatógenos 41
21. Progreso de la mortalidad de diferentes hongos entomopatógenos en *A. Superciliosus* 42

I. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del Proyecto:
"**Control biológico del cabrito de los frutales (*Aegorhinus superciliosus*) mediante la utilización de nemátodos entomopatógenos**".

Código: **C00-1-A-038**

Región: **VIII**

Fecha de aprobación: **29 de diciembre del 2000.**

Agente Ejecutor: **Instituto de Investigaciones Agropecuarias, CRI Quilamapu.**

Agentes Asociados: **Hortifrut, sede Chillán, y Germán Sims San Ruman.**

Coordinador del Proyecto: **Andrés France Iglesias.**

Costo Total: **$93.353.150**

Aporte del FIA: **$43.379.000 (46% del costo total)**

Período de Ejecución: **39 meses.**

II. RESUMEN EJECUTIVO

A partir del 1° de diciembre del 2000 se da inicio al proyecto de "Control biológico del cabrito de los frutales (*Aegorhinus superciliosus*) mediante la utilización de nemátodos entomopatógenos nativos". En la primera etapa se realizan colectas de larvas y adultos de cabritos desde huertos afectados, los primeros para establecer evaluación in vitro de los aislamientos de nemátodos nativos, y los adultos para infestaciones artificiales de frambuesa y crianza del insecto en laboratorio. Se selecciona el aislamiento Qu-N820 (*Steinernema* sp.) como el más agresiva y mayor habilidad parasítica para *Aegorhinus superciliosus*, además de demostrar su capacidad de moverse a diferentes profundidades de suelo para alcanzar las larvas del cabrito.

Desde un comienzo se logran detectar larvas y adultos de cabritos parasitados con hongos entomopatógenos, y se comienzan a utilizar para pruebas de patogenicidad y efectividad en adultos del insecto. Posteriormente, se seleccionan los aislamientos Qu-B306 y Qu-B323 de *Beauveria bassiana*, y el Qu-M430 de *Metarhizium anisopliae*, como los mas efectivos en el control de adultos de *A. superciliosus*.

Los ensayo en terreno, mediante la aplicación de nemátodos con diferentes frecuencias de aplicación indicaron que las mejores aplicaciones se lograban durante el invierno. Las aplicaciones de verano controlan hasta un 38% de larvas de *Galleria*, mientras que las de invierno lograron un 62,4% de control, estabilizándose con 2 aplicaciones de nemátodos en la temporada; las condiciones de temperaturas más bajas y mayor humedad del suelo, serían las principales causas para una mejor sobrevivencia y afectividad del nemátodo. Los tratamientos de arándanos en macetas e inoculadas con larvas de burrito, demostraron que los nemátodos eliminar al insecto y aumentan la biomasa de las plantas, comparada con las plantas sin tratar. Los ensayos en huertos comerciales demostraron que los nemátodos disminuyen la emergencia de adultos de cabritos en 70% durante la temporada. Estos mismos nemátodos fueron efectivos para otras dos plagas de importancia agrícola, *Otiorhynchus sulcatus* y *Asynonychus cervinus*, donde se lograron similares niveles de control.

A consecuencia de los resultados anteriores se realizaron aplicaciones comerciales en 10 huertos, para lo cual se mandó a multiplicar la cepa de nemátodos a España. Los nemátodos retornaron al país formulados y en condiciones de ser almacenados por un tiempo, previo a su uso comercial. A la fecha de entrega de este informe la empresa española estudia la factibilidad de instalarse en Chile, aprovechando la demanda insatisfecha por organismos de control como los nemátodos y la ausencia de biofábricas de nemátodos en el país.

Además, se efectuaron seminarios para agricultores en la VII y X región, presentaciones en Congreso Agronómico de Chile y de Control Biológico (Siconbiol) en Brasil, junto con publicaciones en revistas divulgativas.

TEXTO PRINCIPAL

1. RESUMEN DE LA PROPUESTA

El cabrito o marinerito, *Aegorhinus superciliosus*, es una plaga endémica diseminada desde la VII hasta la X región, su daño se ha incrementado paulatinamente en estos últimos años, al afectar la fruticultura de la zona centro sur y sur del país. El daño producido por los adultos se traduce en mordeduras en la corteza, corte de hojas y racimos florales (Foto 1, Anexo I). Las larvas, por su parte, se alimentan de la corteza de las raíces y provocan galerías que comprometen incluso el xilema (Foto 2). Además, las larvas sellan las galerías con deyecciones y una masa de aserrín, lo que le permite aislarse del medio ambiente, quedando inaccesibles a los controles tradicionales. Las plantas afectadas terminan severamente debilitadas o muriendo (Foto 3).

El control de la plaga es difícil por encontrarse las larvas a diferentes profundidades del suelo y aisladas en sus galerías radiculares, resultando inútiles las aplicaciones de productos químicos. Las aplicaciones de insecticidas a los adultos, pueden resultar efectivas, sin embargo éstas coinciden con la presencia de fruta y la cosecha, impidiendo su uso por problemas de registro y carencias de la fruta de exportación. Además, el insecto es considerado una plaga cuarentenaria, por lo que su presencia en la fruta es causal de rechazo en los mercados de destino.

Una alternativa al control químico y compatible con el medio ambiente, es el uso de nemátodos entomopatógenos. Estos organismos, pueden ser cultivados, masificados y aplicados como un biopesticida. Prospecciones realizadas por INIA-Quilamapu a lo largo de Chile, han permitido colectar mas de 75 aislamientos de nemátodos entomopatógenos. Pruebas preliminares de esta colección, han permitido identificar nemátodos capaces de seguir y parasitar las larvas del cabrito al interior de sus galerías (Foto 4), así como existirían hongos entomopatógenos que pueden matar los estados adultos.

El objetivo general de esta investigación fue desarrollar un control biológico para *Aegorhinus superciliosus*, mediante el uso de aislamientos específicos de nemátodos entomopatógenos, junto con disminuir las pérdidas de producción y el uso de pesticidas químicos, de manera de minimizar el daño a otros organismos que habitan en las plantaciones frutales.

La justificación del proyecto se debe, en parte, a que los insectos endémicos se han considerado tradicionalmente de menor importancia para la agricultura, por estar concentrados en la flora nativa. Sin embargo, la destrucción del medio ha provocado el desplazamiento de alguno de ellos, a especies agrícolas de importancia económica. Tal es el caso del cabrito de la frambuesa, *Aegorhinus superciliosus* Guerin (Coleóptera: Curculionidae), insecto que se encontraba restringido a los bosques nativos de la novena y décima región (Pérez, 1994). Sin embargo hoy en día se encuentra desde la VII a la X región, atacando especies tales como el arándano,

avellano europeo, canelo, frambuesa, frutilla, grosella, maitén, moras, romaza, zarzaparrilla roja, sauce, duraznero y perales (Aguilera, 1988; González, 1989).

Nuestro país, a pesar de tener una experiencia por más de 70 años en control biológico, se ha basado en el control de plagas aéreas y con el uso de insectos benéficos (Artigas, 1994; Prado, 1991). El uso de microorganismos entomopatógenos se ha mencionado solo ocasionalmente, haciendo referencia a introducciones o un encuentro fortuito de un insecto parasitado (Dutky, 1957; Vázquez, 1977). Sin embargo, el Programa de Patología de Insectos de INIA Quilamapu, ha prospectado desde 1996 organismos entomopatógenos a lo largo de todo Chile, demostrando con ello la presencia de hongos y nemátodos entomopatógenos en todo el país. Lo anterior permite disponer de una fuente de diversidad biológica propia, adaptada a las diferentes condiciones ambientales de nuestro país y que no requiere la internación de este tipo de organismos desde otros países.

Los nemátodos entomopatógenos son una de las mejores alternativas de control biológico para una plaga como el cabrito de la frambuesa, ya que poseen la capacidad de buscar a su huésped en lugares donde otros organismos no tiene alternativas de encontrar a su presa. Entre todos los nemátodos que parasitan insectos, especial dedicación se ha dado al estudio de las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, las cuales se caracterizan por tener bacterias simbiontes del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus,* responsables estas últimas de la muerte de los insectos parasitados (Akhurst y Boemare, 1990; Kaya, *et al.*, 1993; Woodring y Kaya, 1988). Estas especies de nemátodos reúnen la mayoría de los atributos que debe tener un efectivo agente de control biológico: matan su huésped rápidamente (24 a 48 horas), son específicos para cada insecto plaga, parasitan a su huésped en lugares donde los productos químicos no son capaces de llegar, son inocuos para vertebrados y plantas, fáciles de propagar y almacenar, capaces de buscar su huésped por si mismos, compatibles con insecticidas y no contaminan el medio ambiente (Bedding, *et al.*, 1993; Ishibashi y Kondo, 1993; Kaya, *et al.*, 1993; Wouts, 1991). El contar con un nemátodo especifico capaz de controlar los estadios larvales de *A. superciliosus*, permitiría disminuir el efecto devastador del cabrito en los huertos, junto con minimizar al máximo el daño a otros organismos benéficos presentes en el hábitat de la plaga.

La metodología consistió en la colecta de adultos, crianza de larvas de *A. superciliosus*, evaluación y selección de nemátodos entomopatógenos, evaluaciones de dosis y ensayos en invernadero, campo y aplicaciones masivas en huertos comerciales de frambuesa y arándanos ubicados entre la VIII y X región. Los resultados permitieron demostrar que los nemátodos entomopatógenos nativos logran controlar larvas de cabritos, así como de otras especies dañinas, tales como el gorgojo de los invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus*) y el capachito de los frutales (*Asynonychus cervinus*).

El proyecto incluyó la presentación de resultados, mediante seminarios a agricultores, participación en congresos agronómicos y de control biológico nacionales e internacionales, y publicaciones divulgativas en revistas y periódicos.

2. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO

El proyecto original contemplaba como objetivo general "Desarrollar un control biológico adecuado para *Aegorhinus superciliosus,* mediante la selección de aislamientos específicos de nemátodos entomopatógenos". Al término del proyecto se puede concluir que el objetivo general se cumplió, aunque parte de los objetivos específicos y actividades propuestas no lograron obtenerse resultados. Durante el desarrollo del proyecto se pudo comprobar la existencia de cepas de nemátodos nativos que podían controlar al cabrito (*A. superciliosus*), estos nemátodos fueron factibles de multiplicar en grandes números, al menos para desarrollar las actividades de laboratorio, invernadero y ensayos de campo. También se comprobó que los nemátodos podían movilizarse por el perfil del suelo, comportamiento necesario para poder alcanzar una plaga cuyo estadío larval se encuentra en el suelo o dentro de las raíces. Los ensayos en macetas comprobaron que el uso de nemátodos en suelo inoculado con larvas, permite eliminar al insecto y logra aumentos significativos en el desarrollo radicular y aéreo. Posteriormente, los ensayos de campo en huertos comerciales afectados por cabritos, demostraron que las inoculaciones de nemátodos deben evitarse en los meses de verano, por problemas de temperatura y sequedad del suelo. Aplicados en la época correcta, las aplicaciones al suelo logran disminuir la emergencia de adultos en aproximadamente 70% durante la temporada.

Además de lo anterior, el uso de la cepa de nemátodos para el control de cabritos también fue efectiva para el control de otras dos plagas de importancia agrícola, como son el gorgojo de los invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus*) y el capachito de los frutales (*Asynonychus cervinus*), insectos tan importantes como el cabrito del duraznero. En estas plagas se logró disminuir la emergencia de adultos en alrededor de un 70% durante una temporada, similar a lo que ocurre con el cabrito, lo que permite usar el mismo nemátodo para controlar estas plagas, las que eventualmente pueden estar afectando las plantas al mismo tiempo.

Producto de estos resultados se realizaron aplicaciones en 10 huertos comerciales, totalizando 11 ha, y cuyos resultados se comprobarán al término de la temporada 2003-2004. Para lograr inóculo suficiente para tales superficies, y previo acuerdo con el SAG, se logró la colaboración de la empresa IDEBIO de España, la que posee biofábricas dedicadas a la producción de nemátodos entomopatógenos en ese país. Debido al interés de los agricultores en utilizar esta herramienta de control, la empresa española se encuentra estudiando la instalación de una biofábrica de nemátodos en nuestro país. Lo anterior permitiría contar con la producción industrial de los nemátodos seleccionados en este proyecto, así como la posibilidad de incluir nuevas cepas para otras plagas tan importantes como el cabrito de los frutales.

Además de los nemátodos, se aislaron y seleccionaron cepas de hongos entomopatógenos que fueron efectivas en el control de adultos. Estas cepas podían sobrevivir en el suelo después de aplicaciones sucesivas y las mezclas de cepas mejoraban el control de adultos. Aunque dichas actividades no eran parte del proyecto original, se incluyeron igualmente debido a que pueden ser un complemento al uso de

nemátodos, ya que podían destinarse al control de adultos que logran escapar a la acción de los nemátodos en el suelo.

Dentro de las actividades que no lograron resultados se encuentran la crianza artificial de cabritos, la que resultó mas compleja y lenta de lo que originalmente se programó, además que no se logró acortar el ciclo natural del insecto. Otro aspecto fallido fue la formulación de los nemátodos con protectores UV y para deshidratación, sin embargo hoy en día está disponible una formulación comercial a través de IDEBIO, la que puede ser almacenada y transportada por varios días, facilitando el uso de estos organismos.

3. ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL PROYECTO

3.1. Selección del mejor aislamiento de nemátodos.

Para seleccionar el aislamiento de nemátodo mas agresivo, se realizaron pruebas sobre larvas de *Aegorhinus superciliosus* (Foto 5), colectadas desde el huerto de ensayo mediante arranca de plantas y disección de raíces. Se evaluaron seis aislamientos de nemátodos entomopatógenos, colectados en diferentes partes del país mediante el sistema de cebado de suelo con larvas de la polilla de la cera (*Galleria mellonella*) y según se describe en Anexo A. La identificación y origen de los aislamientos se indican en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Ubicación y características de los lugares de colecta de los diferentes nemátodos entomopatógenos.

N°	Fecha colecta	Ubicación (Region)	Lat. y Long.		Actividad	Textura suelo	Tipo de nemátodos
21	9/1/96	Human, Los Angeles (VIII)	37°26'	72°02'	Huerto castaño	Trumao	*Diplogaster*
263	14/8/97	Cañete (VIII)	37°47'	73°20'	Cultivo anual	Arenoso	*Diplogaster*
515	15/4/98	Sta. Barbara, Los Angeles (VIII)	37°38'	71°00'	Cultivo anual	Orgánico	*Diplogaster*
560	25/11/98	La Unión (X)	40°15'	73°06'	Pradera mejorada	Trumao	*Diplogaster*
620	12/1/99	Lonquimay (IX)	38°27'	71°21'	Pradera natural	Trumao	*Diplogaster*
820	25/2/99	Puerto Cisne (XI)	44°43'	72°43'	Pradera natural	Ñadi	*Steirnernema*

Cada uno de estos aislamientos fue cultivado en larvas de la polilla de la cera (*Galleria mellonella*) según se describe en Anexo B (Foto 6). Para la inoculación de las larvas de cabritos, por cada aislamiento se utilizaron 50 nemátodos dauers (estado de resistencia que consiste en juveniles en estadío J3 pero que conservan la cutícula de J2), depositados sobre un papel filtro humedecido con agua destilada estéril y dentro de una placa Petra de plástico de 50 mm de diámetro. En el interior de la placa se depositaron 5 larvas de *A. superciliosus,* previamente lavadas superficialmente con agua estéril, constituyéndose en la unida experimental del ensayo. Las placas fueron incubadas en cámara a 21°C y oscuridad permanente.

El diseño experimental fue un completo al azar con 5 repeticiones. Las evaluaciones consistieron en mortalidad diaria, y el progreso de la mortalidad a través del tiempo. Las comparaciones entre aislamientos se realizó mediante la comparación de la mortalidad al día 10 de postinoculación, fecha en la cual se alcanzó el 100% de mortalidad con uno de los aislamientos, mediante análisis de varianza y comparación

de medias a través de la prueba de Tukey. Debido a que la comparación anterior solo refleja las diferencias a un día determinado del ensayo, se utilizó además, como criterio de selección, el área bajo la curva del progreso de la mortalidad, mediante la integración del área que se produce con la curva de mortalidad a través del tiempo, incluidos hasta el día 10 de evaluación. Estas áreas fueron comparadas mediante análisis de varianza y separación de medias mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

3.2. Capacidad de profundización del nemátodo.

Debido a que el uso de estos nemátodos entomopatógenos esta orientado al control de larvas de cabritos, las cuales se encuentran profundas en el suelo o dentro del sistema radicular de las plantas afectadas, se consideró de importancia evaluar la capacidad para profundizarse en el perfil del suelo, buscar a su huésped y lograr parasitarlo. Cinco larvas de *A. superciliosus* fueron depositadas en placas plásticas de 60 mm de diámetro y 25 mm de alto y cubiertas con tierra pasteurizada y una malla plástica, del tipo antiáfido, cubriendo la placa para evitar el desplazamiento de las larvas. Sobre estas placas se colocaron tubos de PVC de 60 mm de diámetro, sellando con huincha adhesiva la unión entre placas y tubos. En el interior de los tubos se agregó de la misma tierra pasteurizada y compactada ligeramente hasta completar las siguientes alturas de suelo: 0, 5, 10, 15 y 20 cm. Sobre el suelo se agregaron una proporción de 50 nemátodos/larva, mediante una suspensión de 250 nemátodos dauers /mL. Los tubos fueron cubiertos en la superficie con papel filtro, incubados a 18°C y oscuridad permanente dentro de una cámara (Foto 7).

Luego de siete días de incubación, las larvas fueron removidas del suelo, lavadas con agua de pozo estéril e incubadas individualmente en cámaras húmedas. Diariamente se revisaron las cámaras en la búsqueda de larvas muertas, considerándose como muertas a aquellas que no se movían y no respondían a la presión con una aguja de madera, todas los cadáveres fueron incubados para observar la aparición de nemátodos y si éstos correspondían a los que fueron inoculados. Los resultados fueron graficados y los tratamientos comparados a través del error estandard ($P=0,05$) del promedio de los tratamientos. El experimento tubo un diseño estadístico completamente al azar con 5 repeticiones.

3.3. Establecimiento de ensayo en terreno. Aplicaciones de verano.

Con la mejor selección de nemátodos se estableció un ensayo en terreno, para lo cual se multiplicó el nemátodo N820 en esponja embebida en nutrientes y se indujo la producción de larvas dauer, según se explica en Anexo B. Las aplicaciones fueron el equivalentes a 300.000 nemátodos/m^2, en parcelas de 5 m^2. Los tratamientos fueron frecuencia de aplicaciones, en intervalos de 15 días, hasta completar 6 aplicaciones, según el esquema del Cuadro 2.

Cuadro 2. Esquema de tratamientos y frecuencia de aplicación de entomopatógenos en los ensayos de terrenos.

Nº tratamiento	Nº de aplicaciones					
	1	2	3	4	5	6
T1	+	+	+	+	+	+
T2	+	+	+	+	+	
T3	+	+	+	+		
T4	+	+	+			
T5	+	+				
T6	+					
Testigo	-	-	-	-	-	-

Los tratamientos se aplicaron en una suspensión acuosa, al atardecer y cubiertos con paja para evitar daño por sol. El diseño del experimento será un bloque completo al azar, bloqueando en el sentido de la mayor densidad de adultos capturados en el potrero y que fue coincidente con el daño visual a las plantas. Las evaluaciones consistirán en recuento de larvas y nemátodos en el suelo, colectados durante los meses de invierno, y número de adultos emergidos en la próxima temporada (Foto 8).

3.4. Establecimiento de ensayo en terreno. Aplicaciones de invierno.

Al igual como se describió el ensayo de verano, se estableció uno similar pero ahora en invierno, considerando que los nemátodos pueden ejercer el parasitismo por un período más prolongado a temperaturas mas bajas. El ensayo fue similar al de verano, se utilizó el aislamiento Qu-N820 que fue multiplicado esta vez in vivo, utilizando un promedio de 300 larvas de *Galleria mellonella*, las cuales fueron inoculadas con 50 nemátodos cada una (ver Anexo C para producción masiva de *Galleria mellonella*). Posteriormente se incubaron a 18ºC por un período de 48 horas, para luego inducir la producción de larva dauer. La incubación se efectuó en placas Petri con base de yeso, la cual permite mantener humedad y una superficie sobre la cual pueden moverse los nemátodos (Anexo D). La colecta de juveniles se realizó por 5 días consecutivos y el resto se descartó, de manera de asegurar a los más agresivos y móviles. Los nemátodos fueron contados y almacenados en frascos para cultivo de tejido a temperatura de 10ºC y obscuridad hasta su utilización.

Para los ensayos de terreno se aplicaron dosis equivalentes a 300.000 nemátados por m^2 , pulverizadas con una bomba manual a presión constante de 1 lb/pulgada^2 en parcelas experimentales de 5 m^2. Los tratamientos fueron número de aplicaciones en intervalos de 15 días, hasta completar seis aplicaciones según el Cuadro 2. Los tratamientos fueron aplicados en suspensión acuosa al atardecer o durante el día, si el clima se presentaba nublado y fresco. El diseño experimental fue de bloques completos al azar con 5 repeticiones. Las evaluaciones consistirán en recuento de nemátodos en el suelo y número de adultos emergidos durante la temporada.

3.5. Crianza artificial de cabritos.

Durante el desarrollo del proyecto se colectaron numerosos adultos de cabritos, entre machos y hembras, que fueron confinados en jaulas de ovipostura de 30 x 20 x 10 cm. Diariamente fueron alimentados con tallos tiernos de frambuesa y mantenidos dentro de cámara de incubación con fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y a una temperatura de 25°C. Las cajas de ovipostura poseían en su base una bandeja plástica lisa, donde se recolectaron diariamente las excretas y huevos. Los huevos fueron encontrados, con ayuda de un estereoscopio, solitarios o en grupo de cuatro y recubiertos con alimento semidigerido y excretas de la hembra, estos huevos una vez secos tomaron un color café castaño.

Los huevos fueron cosechados, separados y lavados con agua estéril, antes de traspasar a placa de Petri de 6 cm de diámetro, que en su interior se encontraban papel absorbente estéril, humedecido a punto de saturación.

Debido a que en forma natural los huevos se encuentran recubiertos por restos de alimentos y excretas, se trato de evaluar el efecto de este recubrimiento en la eclosión y desarrollo inicial de las larvas. Para esto, los huevos fueron separados en dos grupos:

- Huevos lavados y eliminando los residuos de alimento y excretas.
- Sin quitar estos residuos.

Todos los huevos fueron incubados en placas de Petri con papel absorbente humedecido y temperatura de 25°C, por un período de 20 a 22 días; fecha que demoraron en eclosar las larvas (Foto 9). Las larvas fueron alimentadas con brotes tiernos de alfalfa o secciones circulares de 1 cm de espesor de zanahoria. El desarrollo de las larvas fue observado en forma periódica y se modificó la alimentación de acuerdo a los progresos de las larvas y mortalidades observadas. Como la alimentación con zanahoria permitió mejor desarrollo y sobrevivencia de larvas, se probaron densidades de 1 a 6 larvas por trozo de zanahoria, de manera de evitar el posible canibalismo.

3.6. Evaluación de hongos entomopatógenos.

Para los ensayos de patogenicidad con hongos entomopatógenos se utilizaron adultos de *A. superciliosus* colectados desde el huerto de frambuesa ubicado en Cachapoal, VIII Región. Estos fueron mantenidos en cajas con trozos de poliestireno de baja densidad, y hojas y tallos lavados de frambuesa, en una cámara a temperatura constante de 20°C. Los aislamientos de *Metarhizium* y *Beauveria* provinieron de insectos muertos encontrados en terreno (Foto 10) y de larvas y adultos enfermas que llegaron al laboratorio de INIA Quilamapu. Estas larvas fueron incubadas en cámara húmeda en forma individual, dentro de placas de Petri con papel absorbente humedecido con agua estéril. Las estructuras fungosas que se desarrollaron sobre las muertas, fueron cultivadas en placas Petri, con agar papa dextrosa (APD) y repicadas

hasta obtener un cultivo puro. Luego, cada aislamiento fue traspasado a tubo de ensayo con APD y conservado en frío (5ºC) y nitrógeno líquido (-196ºC).

Para obtener inóculo fresco para las pruebas de patogenicidad, se sembró cada aislamiento de hongo en placas Petri con APD y se incubó a 25ºC por 20 días aproximadamente, hasta obtener el cubrimiento de la placa con micelio y esporas (Foto 11). Las conidias fueron colectadas en seco y aplicadas directamente sobre los insectos, utilizando un trozo de agar colonizado por el hongo de 10 mm de diámetro. Se evaluaron 10 aislamientos de *Metarhizium* y 9 de *Beauveria*. Los insectos inoculados fueron mantenidos, en forma individual, en placas con hojas lavadas de frambuesa, las que fueron cambiadas periódicamente. Se evaluó cada 24 horas la mortalidad de insectos y el momento de aparición de signos del hongo.

El diseño experimental utilizado fue uno completamente al azar con 5 repeticiones por aislamiento. Los resultados obtenidos fueron comparados calculando el índice de mortalidad para cada aislamiento: sumatoria del número de insectos muertos cada día, dividido por el número del día y el número total de individuos; y el índice de esporulación: suma del número de insectos que presentaron emisión de esporas cada día, dividido por el número del día y el número total de individuos. Los ensayos se evaluaron hasta el momento en que uno de los aislamientos logró el 100% de mortalidad de insectos. Todos los aislamientos fueron comparados a través de la prueba de Chi-cuadrado para tablas de contingencia de 2x2., evaluando la hipótesis de independencia de que cada índice de mortalidad fue similar al testigo.

3.7. Ensayos en terreno con hongos entomopatógenos.

Las cepas de *Metarhizium* Qu-M430 y *Beauveria* Qu-B306, seleccionadas del experimento anterior, se multiplicaron en forma masiva en granos de arroz estéril. Las esporas fueron colectadas mediante lavado de los granos, contabilizadas y ajustadas a dosis equivalentes a 10^{12} esporas/ha. La multiplicación masiva se explica en Anexo E. Se realizaron aplicaciones equivalente a 5×10^{9} conidias por parcela de 5 m de largo. Las aplicaciones siguieron la misma frecuencia (cada 15 días) y diseño que los tratamientos realizados para los nemátodos (Cuadro 2), por lo cual se establecieron 7 tratamientos, incluidos el testigo, con 6 frecuencias de aplicación.

Los tratamientos fueron aplicado mediante una suspensión líquida pulverizada al atardecer y cubiertos con paja para evitar daño por el sol. El diseño del experimento fue un bloque completamente al azar, con 4 repeticiones. Las evaluaciones consistieron en la colecta de suelos para la realización de trampas de capturas de los hongos entomopatógenos, usando como cebos las larvas de *Galleria mellonella* (ver Anexo F). Los resultados fueron sometidos a análisis de regresión y ajuste de curvas.

3.8. Ensayos en maceta con nemátodos.

Para evaluar el efecto de la dosis de nemátodos sobre el control de larvas del gorgojo de los invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus*), se realizaron inoculaciones con 5 larvas

de último instar por maceta de 1 litro de volumen, y las cuales tenían suelo pasteurizado. Sobre este suelo se transplantaron arándanos variedad Elliot de un año de edad y en activo crecimiento. Los insectos fueron agregados a las plantas ya establecidas el 27 de junio del 2002, una semana después fueron aplicados los nemátodos a cada maceta en diferentes dosis, equivalentes a: 0, 100.000, 200.000 y 300.000 nemátodos/m^2. Los nemátodos fueron aplicados mediante un riego y en forma individual por maceta.

Las plantas se mantuvieron en invernadero y se fertilizaron y regaron regularmente hasta la fecha de evaluación, que fue el 3 de marzo del 2003. Las evaluaciones consistieron en la altura de plantas, área foliar y peso seco de raíces. El ensayo tubo un diseño completamente al azar con 4 tratamientos y 10 repeticiones, donde la unidad experimental fue una planta por maceta. Las evaluaciones se sometieron a análisis de varianza y separación de medias mediante la prueba de Tukey.

3.9. Ensayos en terreno con nemátodos. Persistencia en el suelo.

Se establecieron tres ensayos invernales en huertos de arándanos ubicados en Freire, Villarrica y Purranque, mediante la aplicación de los nemátodos Qu-N820. Considerando que estos nemátodos provienen de Puerto Cisne, XI región, y que se encuentran adaptados a las bajas temperaturas, se eligió la realización de aplicaciones de invierno, para lograr un parasitismo en un período de bajas temperaturas y mayor humedad en el suelo, condiciones que favorecen a los nemátodos entomopatógenos. Qu-N820 fue multiplicado *in vivo* (ver anexo D) y se utilizaron nemátodos dauer que se obtuvieron de larvas de *Galleria mellonell*a. La colecta de dauer se realizó durante los cinco primeros días desde el comienzo de la emergencia de nemátodos desde las larvas, de manera de asegurar la infestación en el suelo con los individuos más agresivos y móviles.

Para los ensayos de terreno los nemátodos fueron aplicados con regaderas al atardecer, utilizando dosis localizadas alrededor de las plantas y equivalentes a 10^5 nemátodos por m^2, en suspensión acuosa como medio de transporte. Las parcelas experimentales fueron de 10 metros lineales. Los tratamientos fueron parcelas tratadas con nemátodos Qu-N820 y parcelas que solo recibieron agua (testigo). El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro repeticiones para Villarrica y Purranque, y seis repeticiones par el ensayo de Freire.

Las evaluaciones se realizaron mediante el muestreo intensivo de 10 submuestras de 500 mL de suelo por repetición y para cada tratamiento, todas las muestras fueron colectadas cerca de cada planta. Lo anterior permitió evaluar un total de 80 submuestras en Villarrica, 80 en Purranque y 120 en Freire. Para cada submuestra se determinó la presencia de nématodos Qu-N820 en el suelo y su actividad parasítica, esto último medido en forma indirecta mediante el sistema de cebado de larvas de *Galleria mellonella* (Anexo F). Además, se midió la presencia de larvas parasitadas con bacterias y hongos entomopatógenos, los que si bien no fueron aplicados a los ensayos, pueden indicar un efecto indirecto de los nemátodos entomopatógenos con

respecto a la actividad de otros organismos de control biológico existentes en los suelos. La actividad parasítica de los entomopatógenos se midió a través del porcentaje de *Galleria* parasitada en cada tratamiento. Los resultados fueron sometidos a una comparación de medias mediante la prueba t de Students.

3.10. Ensayos en terreno con nemátodos. Efectividad del control de cabritos.

Este ensayo se realizó en una plantación de arándanos o frambuesa ubicadas en las IX y X región. Los nombres de los predios, especie cultivada y ubicación se presentan en el Cuadro 3. La aplicación de nemátodos, dosis, fecha y manejo fueron explicadas en el experimento anterior. A diferencia del ensayo anterior, en este caso se evalúa la emergencia de adultos de diferentes especies de insectos, las cuales se obtuvieron desde trampas de captura de 0,5 m^2 distribuidas sobre las plantas tratadas, a la cual se le corto el follaje antes de instalar la trampa (Foto 12). El recuento de adultos se realizó cada 2 ó 3 días desde que se inició la emergencia de éstos.

A pesar que la información de los agricultores indicaban que los lugares a tratar estaban infectados con *Aegorhinus superciliosus*, al momento de la captura de insectos se comprobó que no todos tenían esta plaga, sin embargo, los otros curculionidos capturados (*Asynonychus cervinus* y *Otiorhynchus sulcatus*) son igualmente dañinos para las plantaciones de berries, y por consiguiente la información tiene igual validez para el manejo de plagas.

Cuadro 3. Huertos, ubicación y plagas bajo ensayo.

Nombre del huerto	Especie	Variedad	Edad (años)	Ubicación
Agrícola San Judas Tadeo	Arándanos	Elliot	5	Freire, IX región
Agrícola Torrelaguna	Arándanos	Berckley	9	Villarrica, IX región
Agrícola Giddings	Arándanos	Elliot	9	Purranque, X región
Agropecuaria Sagalú Ltda	Frambuesa	Meeker	8	La Unión, X región

3.11. Efecto de los hongos entomopatógenos en adultos de cabritos.

Este ensayo se realizó en laboratorio mediante la aplicación de esporas de hongos entomopatógenos sobre adultos de *Aegorhinus superciliosus*. Para imitar una aplicación comercial de campo se utilizó la torre de Potter, la cual permite aplicar dosis conocidas de inóculo sobre una superficie determinada, para esto se utilizaron placas Petri con 10 adultos de cabritos y sobre ellos se aplicaron una dosis equivalente de 10^{12} esporas/ha. Los insectos tratados fueron mantenidos en cajas plásticas y alimentados diariamente con tallos frescos de frambuesa.

Los tratamientos consistieron en la combinación de tres hongos, que resultaron promisorios en evaluaciones previas con la colección de hongos entomopatógenos de INIA (ver Figura 6), estos fueron:

- Testigo (solo agua),
- Qu-B306,
- Qu-B323,
- Qu-M430,
- Qu-M430 + Qu-B306,
- Qu-M430 + Qu-B323,
- Qu-B306 + Qu-B323 y
- Qu-M430 + Qu-B306 + Qu-B323

El diseño estadístico consistió en un completo al azar con cinco repeticiones, donde la unidad experimental fueron 10 adultos. Diariamente se midió la mortalidad de los insectos y por espacio de 19 días. Los resultados fueron sometidos a comparación múltiple mediante comparación del área bajo la curva del progreso de la mortalidad.

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS

La descripción de actividades y tareas ejecutadas del proyecto fueron las siguientes:

4.1. Colecta de larvas y adultos de *A. superciliosus*.

Se colectaron larvas y adultos de *A. superciliosus* desde octubre del 2000 hasta diciembre del 2002. Estas colectas fueron realizadas en los meses de verano para los adultos y en primavera y otoño para las larvas. Para realizar todos los ensayos descrito se ocuparon grandes cantidades de insectos, lo que significó una gran cantidad de mano de obra en buscar, seleccionar y almacenar cabritos. En el caso de los adultos, se contó con ayuda extra por parte de los agricultores.

4.2. Crianza de *A. superciliosus*

Los adultos colectados en la etapa anterior fueron mantenidos en cámaras de crianza, parte de ellos se utilizaron directamente en ensayos de selección de nemátodos, inoculaciones, dosis y control en macetas. El resto fue utilizado para establecer la crianza, la que se realizó en cámaras de crianza con temperaturas controladas. Mayores detalles de la crianza se presentan en el punto 3.5. La crianza de cabritos se inició en noviembre del 2000 y se prolongó hasta abril del 2003.

4.3. Multiplicación de nemátodos entomopatógenos.

La multiplicación de nemátodos se realizó tanto para los aislamientos pertenecientes a la colección, como para el aislamiento seleccionado (Qu-N820). Inicialmente estas cepas se encontraban criopreservados, por lo cual fueron descongelados y multiplicados en vivo utilizando para ello larvas de *Galleria mellonela* (polilla de la cera) (Foto 13 y 14). Esta actividad se inició en noviembre del 2000 y terminó en agosto del 2003.

4.4. Evaluación y selección de la colección INIA de nemátodos entomopatógenos.

Originalmente se contemplaba evaluar y seleccionar un numero mayor de cepas de nemátodos, lo que en la práctica se restringió a solo seis aislamientos, ya que se dio preferencia solo a especies del género *Steinernema*, posteriormente a la elaboración del proyecto se constató que la mayoría del cepario de nemátodos pertenecía a *Diplogaster*, los cuales son menos efectivo en el control de insectos, así como el proceso de multiplicación. La selección de cepas se realizó solo al inicio del proyecto, entre enero y octubre del 2001.

4.5. Pruebas de dosis y tiempo letal.

Los tiempos letales se determinaron al mismo tiempo que se evaluaba la selección de cepas. En la práctica esta determinación de tiempo no tubo mucho sentido, ya que los tiempos en laboratorio son muy cortos, situación que cambia en terreno. Determinar en terreno tiempos letales es imposible de lograr ya que el sistema de evaluación de larvas es destructivo, al obligar a arrancar las plantas e incluso disectar las raíces para

encontrar las larvas. Respecto a las dosis letales solo se utilizaron tres dosis, por lo cual no se pudo establecer una regresión confiable para determinar este parámetro. Sin embargo, la dosis que tradicionalmente menciona la bibliografía (300.000 nemátodos/m^2) fue la que se consideró comercial, dosis menores también fueron efectivas en ensayos de macetas. Estas pruebas se realizaron entre febrero y diciembre del 2002.

4.6. Pruebas de efectividad los nemátodos entomopatógenos.

Estas pruebas se realizaron con el aislamiento Qu-N820, desde abril del 2002 y se mantuvieron hasta el término del proyecto. Las pruebas fueron ejecutadas en placas Petri, mecetas y campo, en este último caso se consideraron diferentes condiciones, huéspedes y aplicaciones, las que se describen en cada etapa correspondiente.

4.7. Elaboración de una preparación comercial capaz de proteger a los nemátodos contra la desecación y la radiación ultravioleta.

Esta actividad no fue lograda, la producción comercial de nemátodos entomopatógenos esta reducida al secreto industrial y casi no existe bibliografía sobre el tema. En nuestro caso los productos que se mencionaron en el proyecto original resultaron letales para los nemátodos, por lo cual no se pudo logra una formulación comercial. Sin embargo, durante el desarrollo del proyecto se contactó una empresa española que se dedica a la producción comercial de estos organismos, y quienes realizaron la producción masiva y formulación de nemátodos (Fotos 15 y 16), pero siempre dentro del secreto industrial. Esta producción masiva permitió la realización de ensayos a gran escala.

4.8. Aplicación y dosificación de campo.

Originalmente el proyecto contemplaba solo hacer aplicaciones en un solo predio y en una superficie no mayor de 5 ha. Sin embargo, el proyecto terminó con la aplicación de 10,9 ha entre 10 predios ubicados desde la VII a X región (Anexo G). Estas aplicaciones masivas comenzaron en enero del 2003 y se mantienen hasta la fecha de este informe (Fotos 17, 18, 19 y 20).

4.9. Actividades de transferencia.

El proyecto realizó seminarios en la VII y X región, presentaciones en congresos de Agronomía y Control Biológico en Chile, Argentina y Brasil. También se elaboraron artículos divulgativos y una entrevista en el diario.

5. RESULTADOS DEL PROYECTO

5.1. Selección del mejor aislamiento de nemátodos.

Los síntomas presentados por las larvas parasitadas de *A. superciliosus* fue una disminución notoria del consumo de alimento, heridas en el cuerpo de color café oscuro; ocasionadas por la entrada de los nemátodos a través de las aberturas naturales de la larva (boca, ano y espiráculos), y coloración rojiza del cuerpo (Foto 4). La mortalidad se produjo desde el primer día de postinoculación, siendo el aislamiento Qu-N820 la más patogénica para las larvas, alcanzando un 100% de mortalidad a los 10 días (Figura 1). El testigo no presento mortalidad en el transcurso del ensayo.

Transcurrido 10 días de la inoculación, el aislamiento Qu-N820 produjo 100% de mortalidad, mientras que los otros aislamientos no alcanzaron tal porcentaje, sin embargo Qu-N21, Qu-N515, Qu-N560 y Qu-N620 fueron estadísticamente similares a Qu-N820 (P=0,05). Solo el aislamiento Qu-N263 fue estadísticamente inferior al aislamiento Qu-N820 (P=0,002) (Figura 2).

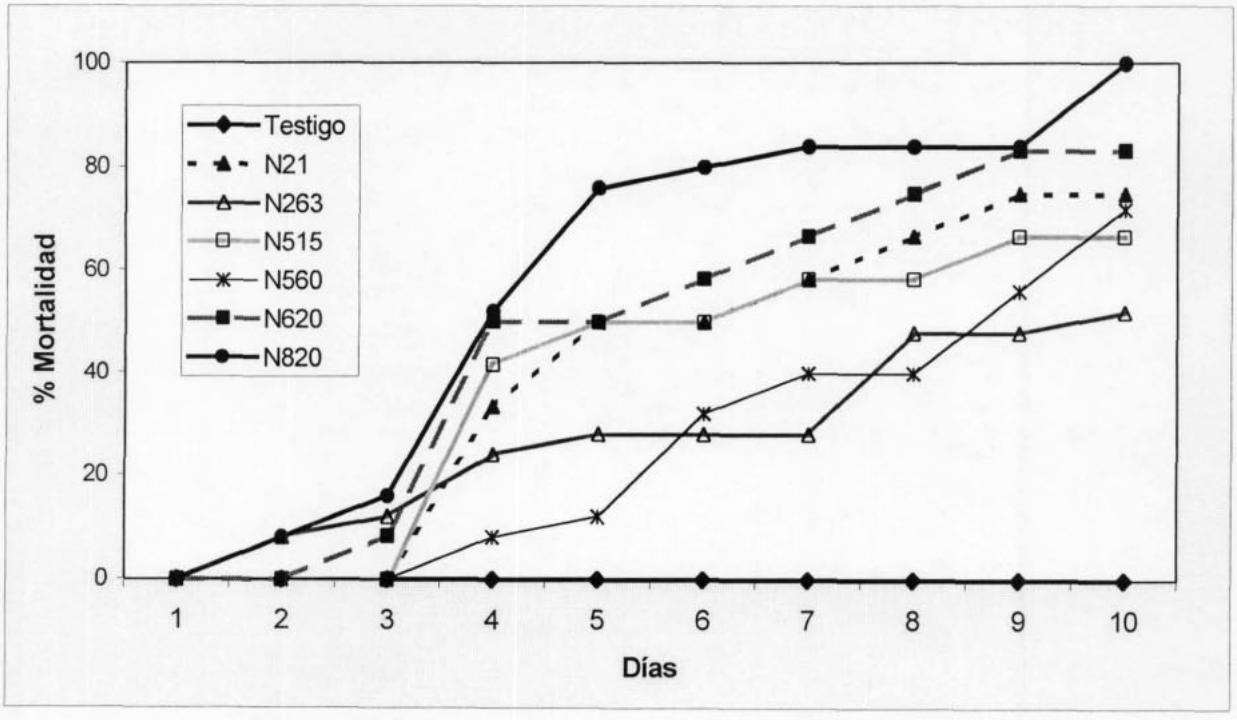


Figura 1. Mortalidad a través del tiempo de larvas de *Aegorhinus superciliosus* inoculadas con diferentes aislamientos de nemátodos entomopatógenos.

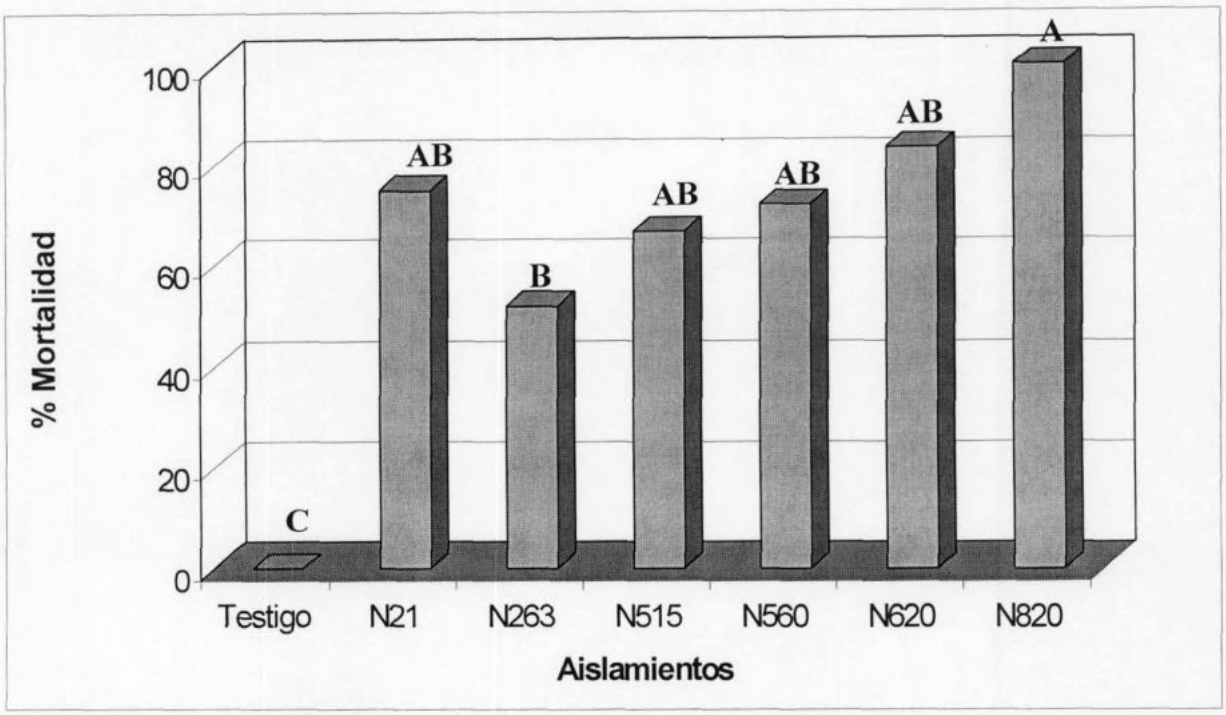


Figura 2. Mortalidad de larvas de *Aegorhinus superciliosus* a los 10 días de postinoculación con diferentes aislamientos de nemátodos entomopatógenos. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas de acuerdo al test de Tukey (P=0,05).

5.2. Capacidad de profundización del nemátodo.

Los resultados indicaron que los nemátodos fueron capaces de atravesar las diferentes profundidades de suelo y parasitar a las larvas. Solamente aquellos nemátodo que quedaron en contacto con las larvas lograron matar el 90% de éstas, luego del primer día de incubación, y superando estadísticamente a los otros tratamientos. Las diferencias anteriores ($P \leq 0,05$) se mantuvieron hasta el día 5 de postinoculación, esto sin considerar los 7 días previos a la incubación. Las otras profundidades de suelo se comportaron de manera similar en cuanto a la mortalidad: el primer día de incubación se alcanzó un 50% de mortalidad promedio, para aumentar progresivamente hasta alcanzar el 100% a los 12 días (Figura 3).

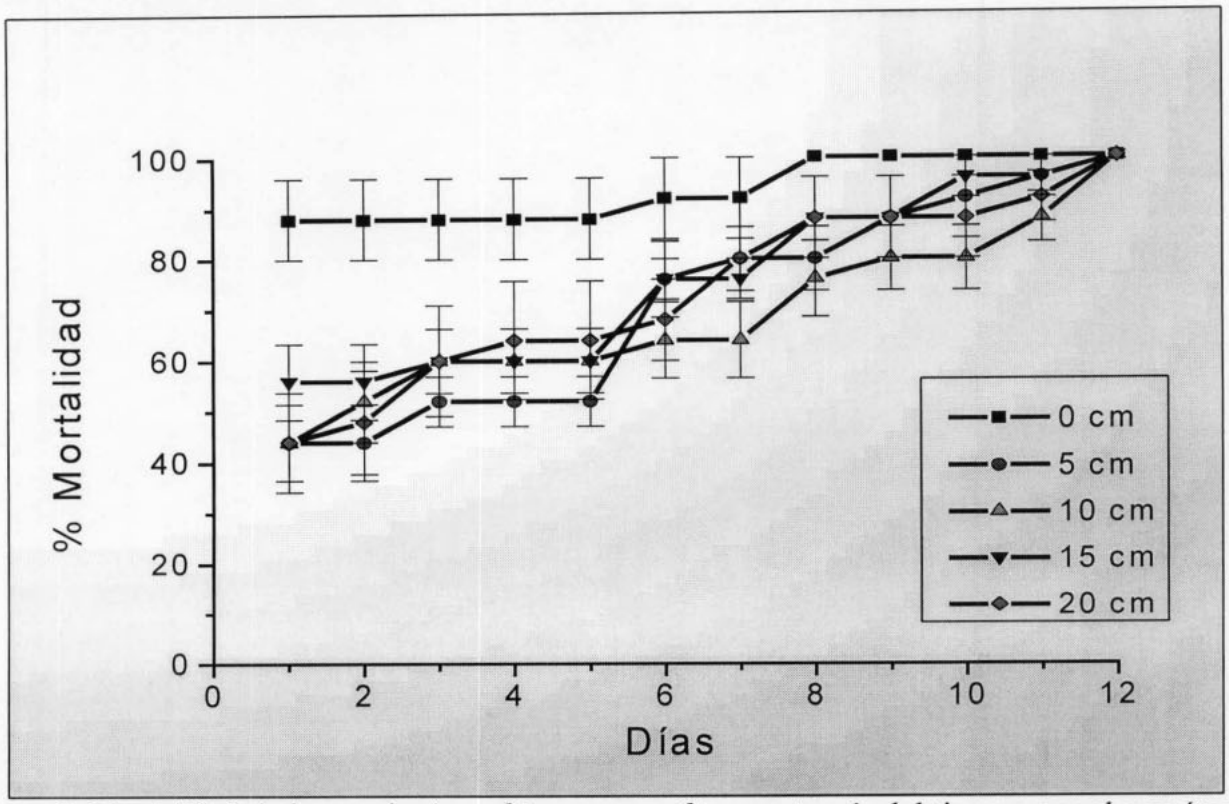


Figura 3. Mortalidad de larvas de *Aegorhinus superciliosus* a través del tiempo por el nemátodo entomopatógeno aislamiento Qu-N820 inoculado a diferentes distancias dentro de una columna de suelo. Las barras indican el error estándar de los promedios (P=0,05).

5.3. Establecimiento de ensayo en terreno. Aplicaciones de verano.

Los resultados de las aplicaciones de Qu-N820 durante el verano indicaron que se produjo sobrevivencia de los nemátodos y que su efectividad, medida en forma indirecta por el parasitismo a larvas de *G. mellonella*, fue en aumento a medida que se incrementó el número de aplicaciones, indicando una respuesta lineal (R^2= 0,79) entre el número de aplicaciones y el porcentaje de parasitismo de larvas (Figura 4). Sin embargo, el grado de efectividad fue reducida, alcanzando a solo un 38% de larvas parasitadas después de cinco aplicaciones. Este resultado parcial se pudo deber a una mayor mortalidad del nemátodo por efecto de las altas temperaturas del verano, la presencia de suelos secos o menor contenido de humedad, necesarios para la movilidad del nemátodo dentro del perfil del suelo.

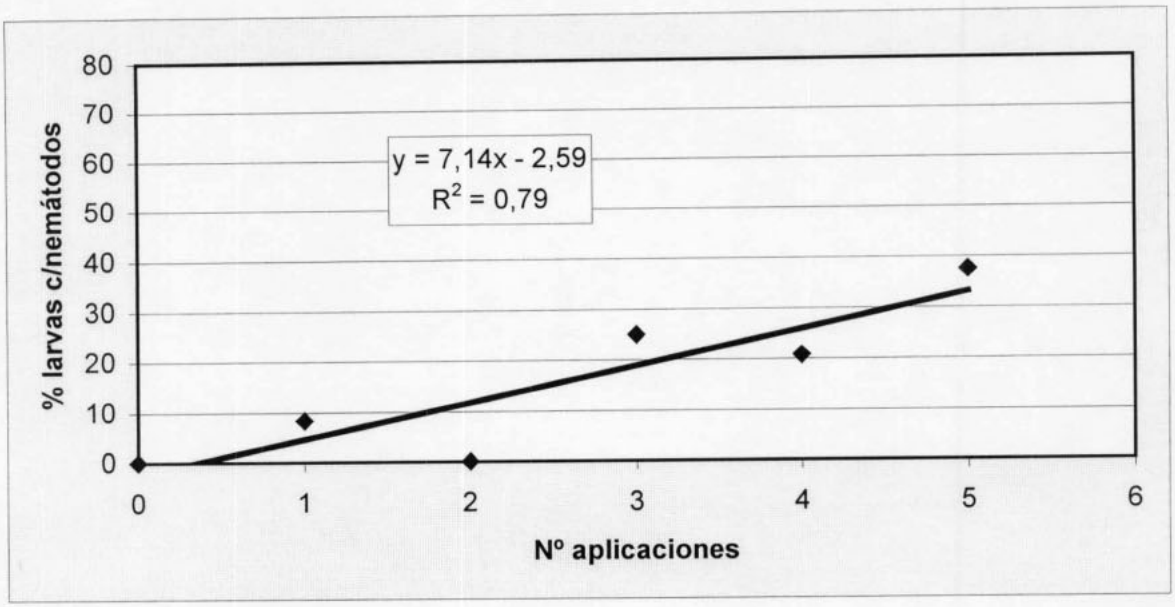


Figura 4. Regresión del número de aplicaciones de nemátodos *Steinernema* sp. sobre el porcentaje de larvas de *Galleria mellonella* parasitadas con nemátodos. Aplicación de nemátodos en verano.

5.4. Establecimiento de ensayo en terreno. Aplicaciones de invierno.

Al igual que el ensayo anterior, se realizó la detección de nemátodos en las muestras de suelo colectadas del ensayo y evaluadas en forma indirecta, mediante el parasitismo que se produjo en larvas de *G. mellonella* utilizadas como cebo. Los resultados indicaron que se logró una respuesta tipo curva de saturación, explicada por la fórmula de Boltzman (χ^2= 96,97 y P<0,001) y la cual se estabiliza en 62,4% de control con dos aplicaciones. La curva se comportó indiferente a mayor número de aplicaciones (Figura 5).

Los resultados de este ensayo indican que la detección de nemátodos en los suelos tratados fue mejor que las aplicaciones de verano, alcanzándose un mejor nivel de permanencia de larvas dauers y eventualmente de control. Lo anterior se podría explicar por las condiciones ambientales de menor temperatura y mayor humedad del suelo, justificando el uso de estos organismos durante el invierno y evitar su aplicación en los meses de mayor calor.

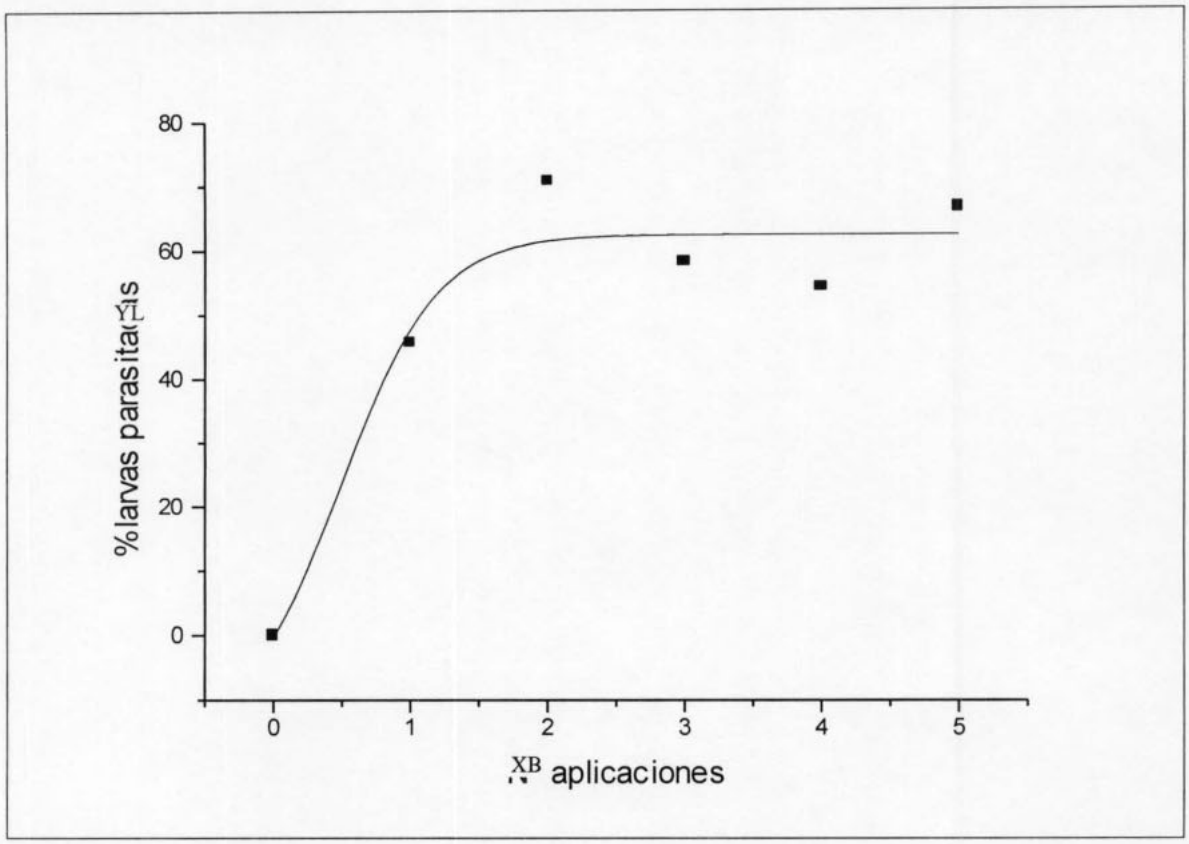


Figura 5. Regresión de Boltzman (X^2=96,97 y P<0,001) del número de aplicaciones de nemátodos *Steinernema* sp. sobre el porcentaje de larvas parasitadas de *Galleria mellonella* con nemátodos. Aplicación de nemátodos en invierno.

5.5. Crianza artificial de cabritos.

La crianza artificiales que se trataron de establecer durante el desarrollo del proyecto no lograron su objetivo, aunque se hizo un gran esfuerzo en iniciar las crianzas con numerosos ejemplares, durante el primer año se trabajo con 300 adultos, de los cuales se lograron recuperar solo 348 huevos, lo cual dio una tasa muy baja de ovipostura (2,3 huevos/hembra), equivalente a solo un 1,5% de la cantidad de huevos esperada. Sin embargo, los huevos eclosaron casi el 100%, pero las larvas neonatas tuvieron una muy baja sobrevivencia (Foto 9). Las larvas muertas fueron observadas al microscopio e incubadas para determinar la causa de muerte. De acuerdo a lo anterior, los resultados de mortalidad se debieron principalmente a hongos y en segundo lugar bacterias, lo cual puede ser consecuencia de la mortalidad natural, ya que no se reconocen como organismos entomopatógenos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Causa y porcentajes de mortalidad de larvas de cabritos (*Aegorhinus superciliosus*) bajo cultivo artificial.

Causa u organismo	**Mortalidad (%)**
Penicillium	46,83
Bacterias	29,02
Canibalismo	15,80
No determinada	6,89

Respecto a las diferentes densidades de larvas por trozo de zanahoria, los mejores resultados se obtuvieron con 1 larva/ disco de zanahoria, donde se lograron larvas que vivieron por 3,5 meses y alcanzaron un tamaño de 4 mm de largo, antes de morir. Los resultados se explican por el efecto del canibalismo entre larvas, en consecuencia la crianza debe realizarse en forma individual para evitar pérdida de individuos.

En una segunda temporada de crianza se partió con una población de 4.619 adultos, desde los cuales se lograron colectar 776 huevos, situación que indica que las hembras nuevamente no ovipusieron a la tasa esperada. Esta disminución podría deberse al estrés que significa para el insecto estar confinado, la posibilidad que la mayor parte de los huevos ya hayan sido depositados al momento de la captura o, con mayor probabilidad, la regulación de la población que pueden ejercer los insectos al encontrarse en un ambiente sobrepoblado, lo cual los inhibe a reproducirse o aumentar su ovipostura. Sin embargo, estas posibilidades necesitan futuros estudios.

Del total de huevos se observó la eclosión de 404 larvas, las que murieron paulatinamente, observándose falta de apetito y desarrollo de algunos hongos. La captura de adultos y producción de huevos y larvas se presenta en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Captura de adultos de *Aegorhinus supercillosus,* ovipostura y producción de larvas en cautiverio.

Fecha	**III. N° adultos**	**N° huevos**	**N° larvas**
13-12-01	735		
18-12-01	567		
26-12-01	658		
02-01-02	436		
08-01-02	396	144	
16-01-02	204	45	
22-01-02	134	26	8
30-01-02	170	35	26
19-02-02	396	127	12
22-02-02	228	101	78
28-02-02	153	57	45
04-03-02	207	97	91
08-03-02	203	95	95
11-03-02	132	49	49
TOTAL	4619	776	404

5.6. Evaluación de hongos entomopatógenos.

Los aislamientos presentaron diferencias en patogenicidad, de acuerdo al test de χ^2. De los 19 aislamientos aplicados, 17 causaron algún grado de mortalidad en adultos de cabritos. El testigo y los tratamientos Qu-M146 y Qu-B73 no presentaron mortalidad mientras duró el ensayo (Cuadro 6). Luego de algunos días de incubación en cámara húmeda, en 11 aislamientos se observó emisión de micelio y luego de esporas en las zonas menos esclerosadas del tegumento del insecto (Foto 10).

Cuadro 6. Aislamiento, mortalidad, esporulación y probabilidad de similitud con el testigo (χ^2), en adultos de *Aegorhinus superciliosus* inoculados con distintas aislaciones de *Metarhizium* (M) y *Beauveria* (B).

N° Aislamiento	IM[1]	IE[2]	Probabilidad[3] χ^2
Qu-M 145b	0,61	0	0,081
Qu-M 146	0	0	1,000
Qu-M 151b	0,28	0,21	0,163
Qu-M 156a	0,22	0,18	0,294
Qu-M 171a	0,39	0,1	0,458
Qu-M 173c	0,61	0	0,094
Qu-M 233a	0,56	0,1	0,081
Qu-M 363	0,28	0	0,237
Qu-M 421	0,22	0,1	0,294
Qu-M 430	1,33	1,2	0,025
Qu-B 47	0,22	0	0,527
Qu-B 73	0	0	1,000
Qu-B 187	0,22	0,48	0,357
Qu-B 273	1,5	0,11	0,094
Qu-B 306	1,83	1,28	0,032
Qu-B 321	1,22	0	0,058
Qu-B 326	1,5	0,48	0,058
Qu-B 378	0,28	0	0,138
Qu-B 452	1,22	0	0,163
Testigo	0	0	1,000

[1] Indice de Mortalidad: Σ(n° de insectos muertos/(n° día x n° total de insectos)).
[2] Indice de Esporulación: Σ(n° de insectos con emisión de esporas /(n° día x n° total de insectos)).
[3] Probabilidad de χ^2 para tabla de contingencia de 2x2 entre el testigo y el respectivo Indice de Mortalidad.

Para seleccionar los aislamientos más patogénicos y capaces de producir esporas sobre el insecto, se construyó un gráfico de dispersión con los índices de mortalidad y de esporulación de cada aislamiento, y se seleccionó aquellas cepas que superaron el percentil 80, tanto para el índice de mortalidad como para el de esporulación (Figura 6). De acuerdo a estos percentiles, los aislamientos seleccionados fueron Qu-M430 y

Qu-B306, que fueron los que presentaron mayores índices y fueron diferentes al testigo (P<0,05).

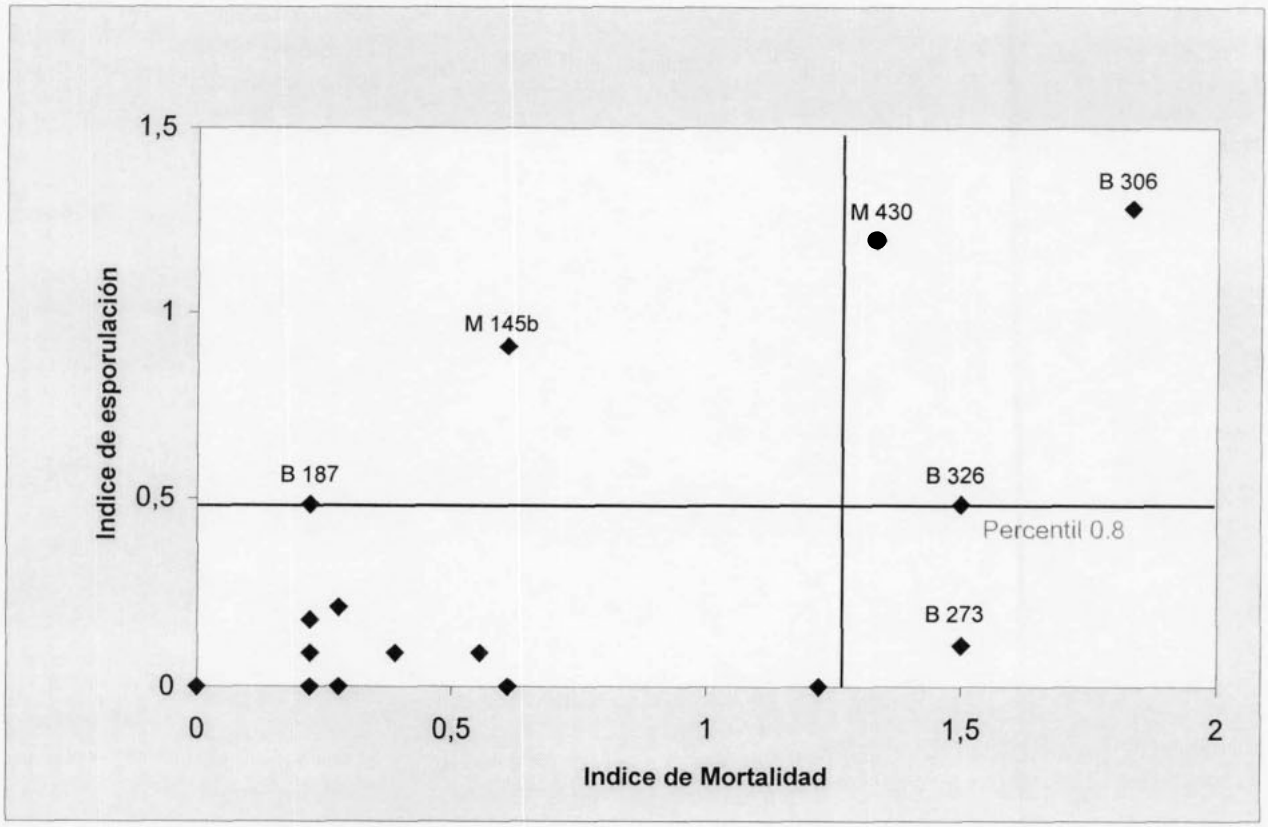


Figura 6. Mortalidad y emisión de esporas en adultos de *Aegorhinus superciliosus* inoculados con distintos aislamientos de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp.

5.7. Ensayos en terreno con hongos entomopatógenos.

5.7.1. Evaluación del hongo *Beauveria*.

Las trampas de *G. mellonella* indicaron que no existió una tendencia clara a través de una curva de respuesta. A pesar que se logró alcanzar el 100% de parasitismo con el mayor número de aplicaciones, los valores intermedios no mostraron una tendencia creciente que pudieran justificar de mejor forma la curva de regresión ajustada, a pesar que ésta alcanza un coeficiente de correlación de 0,83 (Figura 7). En todo caso se esperaría que se obtuviera una curva de saturación similar a la del ensayo de nemátodos de invierno.

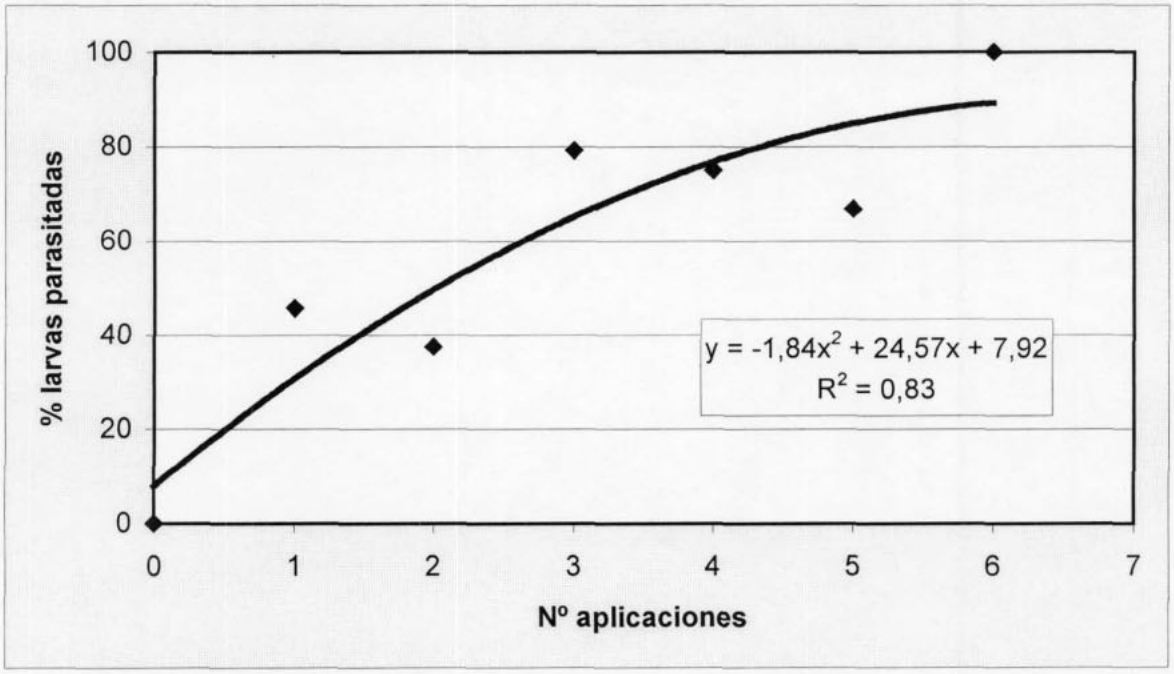


Figura 7. Curva de respuesta del número de aplicaciones de *Beauveria basssiana* sobre el porcentaje de larvas parasitadas de *Galleria mellonella* con hongos.

5.7.2. Evaluación del hongo *Metarhizium.*

Similar al ensayo anterior, se observó un efecto positivo en el parasitismo de larvas de *Galleria,* a medida que se realizaron diferentes números de aplicaciones de *Metarhizium anisopliae*. Sin embargo, la respuesta fue indiferente entre aplicar una o seis aplicaciones, encontrándose una respuesta tipo curva de saturación, explicada por la fórmula de Boltzman (χ^2= 57,72 y P<0,001) y la cual se estabiliza en 75% de control a partir de una aplicación. La curva se comporta indiferente a mayor número de aplicaciones (Figura 8).

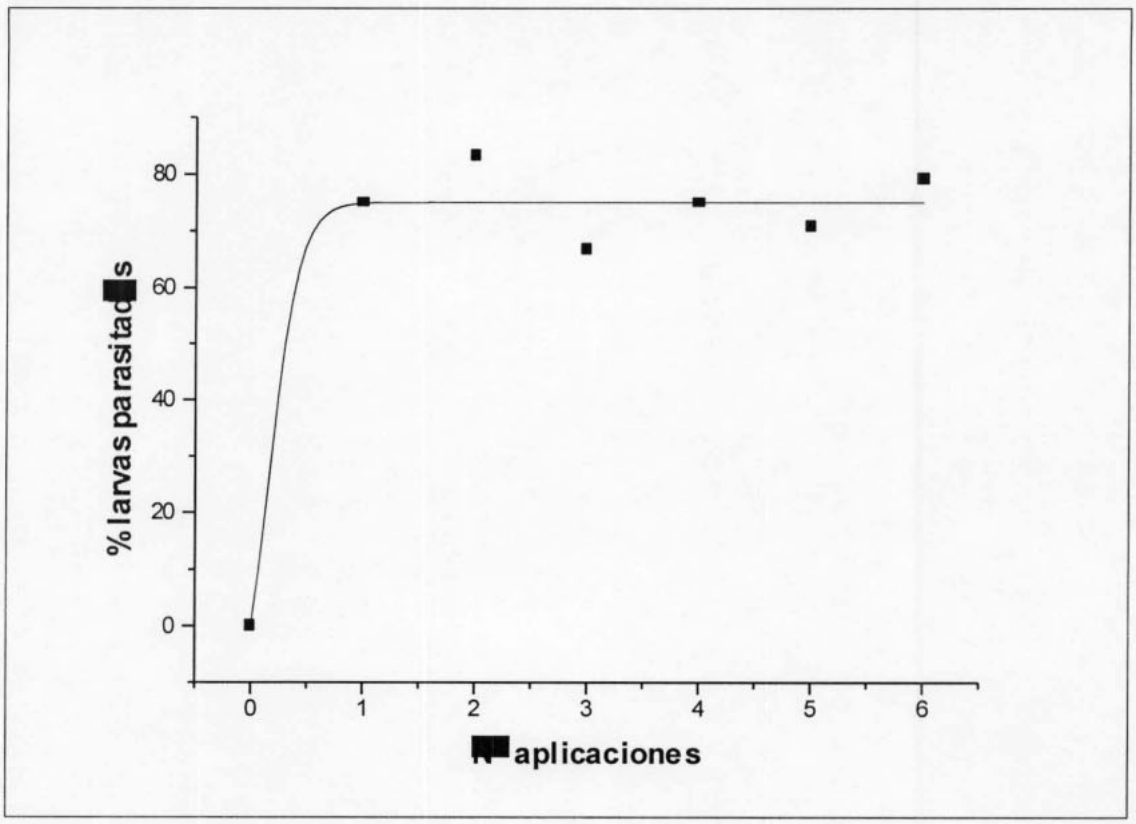


Figura 8. Regresión de Boltzman (χ^2=57,72, P<0,001) del número de aplicaciones de *Metarhizium anisopliae* sobre el porcentaje de larvas de *Galleria mellonella* parasitadas con hongos.

5.8. Ensayos en maceta con nemátodos.

Los ensayos de inoculación artificial en macetas con plantas de arándanos y larvas de *Otiorhynchus sulcatus*, indicaron que las aplicaciones de nemátodos mejoraron la altura de plantas con respecto al testigo (P<0,001). Las tres dosis de nemátodos no mostraron diferencias estadísticas entre ellas, promediando una altura de 61,4 cm; lo cual fue superior en un 31,8% al tratamiento testigo (Figura 9).

Respecto al área foliar de las plantas, se observó una gran diferencia entre tratamientos (P<0,001). Todas las macetas que llevaron nemátodos superaron ampliamente al testigo, el cual presentó una desfoliación prematura y una menor calidad de hojas, ya que éstas se presentaron rojizas o con necrosis apical, lo cual disminuye aun más el área fotosintética (Foto 21). Entre los tratamientos que llevaron nemátodos, también se observaron diferencias estadísticas, siendo la dosis más alta la que produjo mayor área foliar (P=0,05) comparado con las otras dosis menores (Figura 10).

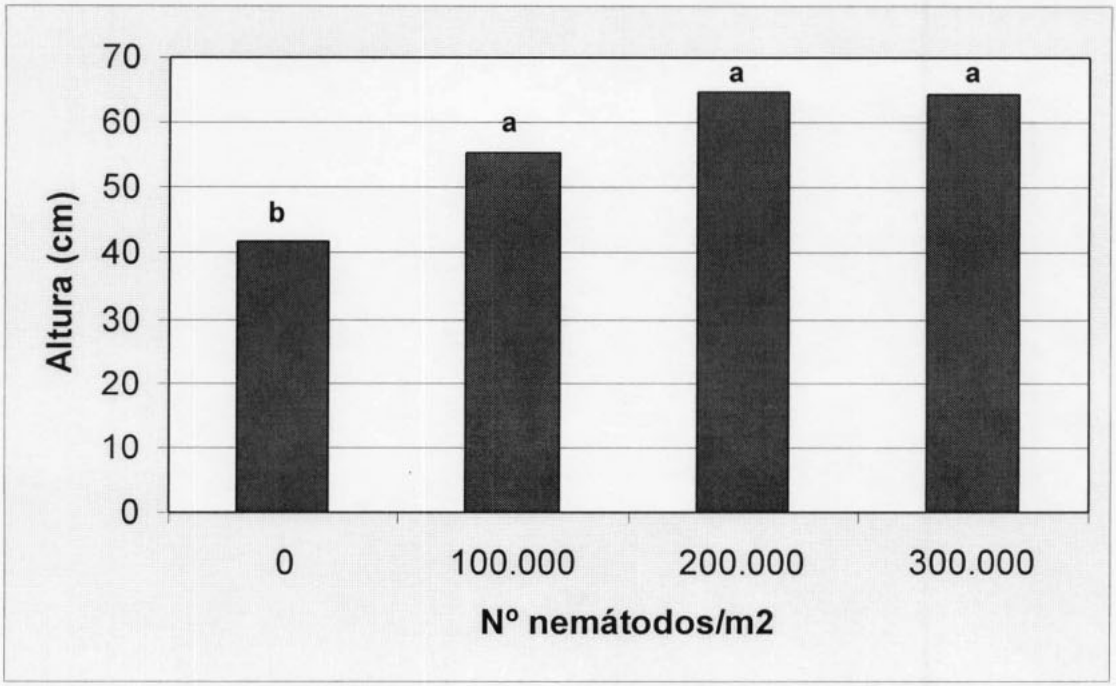


Figura 9. Efecto en la altura de plantas en macetas de arándanos infectadas con *Ottiorhynchus sulcatus* e inoculadas con diferentes dosis de nemátodos *Steinernema* sp. (Qu-N820). Barras con letras distintas indican diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de Tukey (P=0,05).

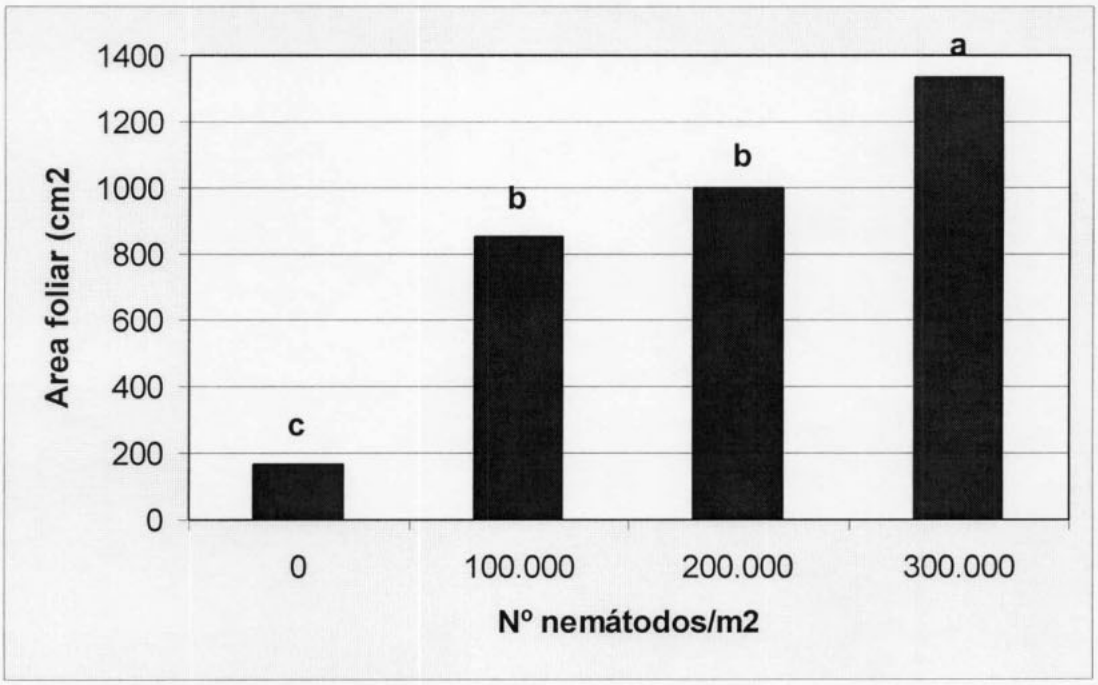


Figura 10. Efecto en el área foliar de plantas en macetas de arándanos infectadas con *Ottiorhynchus sulcatus* e inoculadas con diferentes dosis de nemátodos *Steinernema* sp. (Qu-N820). Barras con letras distintas indican diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de Tukey (P=0,05).

Respecto al peso seco de raíces, el análisis de varianza indicó diferencias estadísticas entre tratamientos (P=0,02). Sin embargo, esta diferencia estadística solo se produjo entre los tratamientos testigo y aquel que llevó la mayor dosis de nemátodos, superando en un 52% el peso seco de las raíces sin tratamientos (Figura 11).

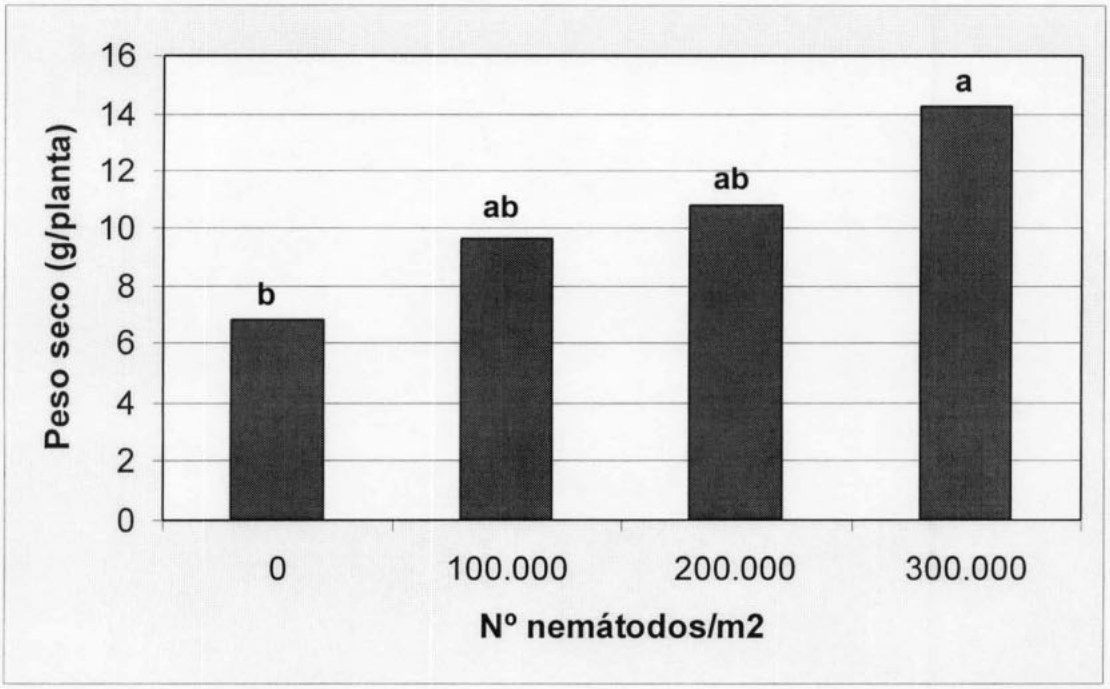


Figura 11. Efecto en el peso seco de raíces de plantas en macetas de arándanos infectadas con *Ottiorhynchus sulcatus* e inoculadas con diferentes dosis de nemátodos *Steinernema* sp. (Qu-N820). Barras con letras distintas indican diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de Tukey (P=0,05).

Este comportamiento del peso seco de raíces se puede explicar por que los resultados presentaron una gran variabilidad, producto de que este insecto se caracteriza primero por alimentarse de raicillas, lo cual no afecta significativamente el peso pero si la absorción de nutrientes, traduciéndose en síntomas de deficiencias en las hojas y defoliación. A medida que el insecto muda a sus últimos instares, se alimenta de corteza de raíces, produciendo un anillado que puede matar la planta, sin embargo, algunas plantas responden emitiendo nuevas raíces sobre el área dañada, lo cual influye sobre el peso seco de raíces.

La Figura 12 muestra las diferencias visuales en la masa radicular de las plantas de cada tratamiento, estas diferencias visuales no se manifiestan en igual medida cuando se lleva a peso seco, ya que la gran diferencia esta en las raicillas, las que aportan poco al peso total, comparado con las raíces primarias.

Figura 12. Efecto del daño de larvas de *Otiorhynchus sulcatus* en plantas de arándanos en macetas e inoculadas con diferentes dosis de nemátodos *Steinernema* sp. (Qu-N820). De izquierda a derecha cada planta recibió el equivalente a 0, 100.000, 200.000 y 300.000 nemátodos por m2.

5.9. Ensayos en terreno con nemátodos. Persistencia en el suelo.

5.9.1. Huerto Villarrica.

La mortalidad de larvas de *Galleria* debido al parasitismo por nemátodos Qu-N820, alcanzó un valor de 69,6% de promedio y fue altamente significativo ($P<0,001$), comparado con los tratamientos sin aplicación de nemátodos (Figura 13). Además, se encontró un efecto de los tratamientos sobre las *Gallerias* muertas por bacterias y hongos entomopatógenos, en el primero la mortalidad de larvas llegó a un 26,25% ($P=0,018$) cuando se aplicó nemátodos, comparado con un 2,08% cuando los tratamientos no llevaron nemátodos. Sin embargo, en el caso de las larvas muertas por hongos la situación fue al revés, la mayor mortalidad (24,58%) por estos organismos fue en las parcelas que no fueron tratadas con nemátodos, porcentaje estadísticamente diferente al de los tratamientos con nemátodos ($P=0,001$).

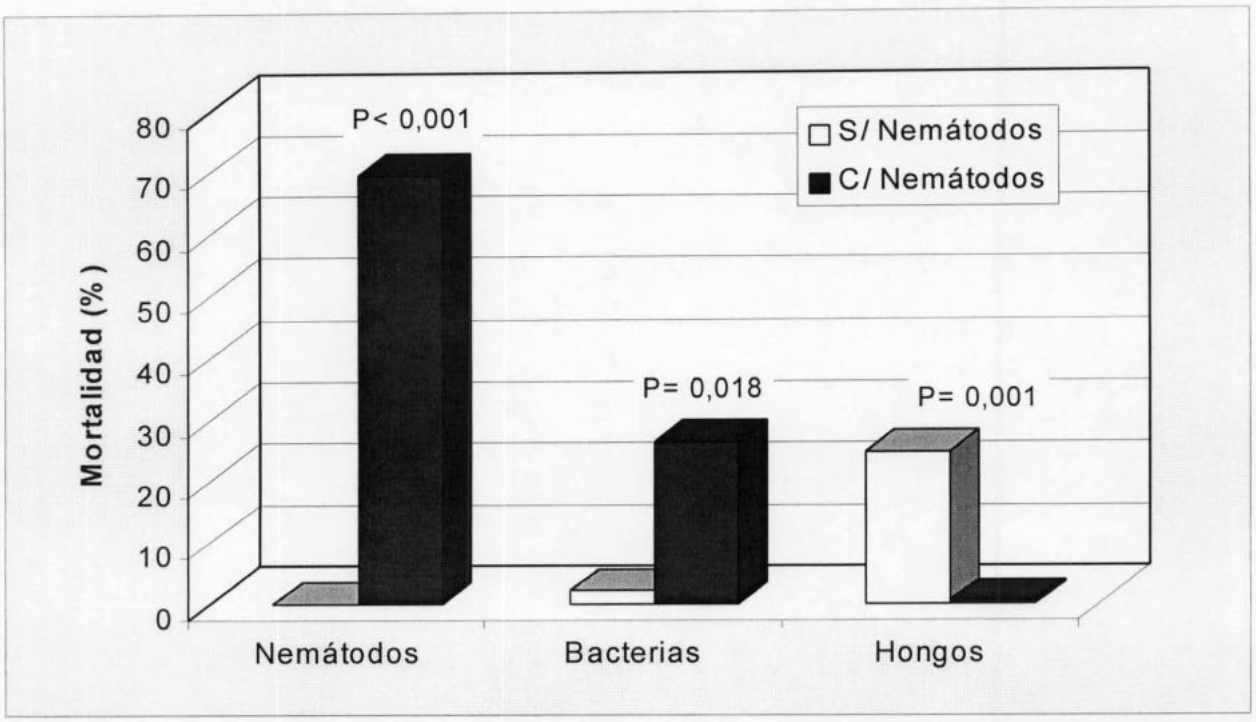


Figura 13. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* de suelos tratados con nemátodos *Steinernema* sp (Qu-N820). Ensayo de Villarrica.

La mortalidad por bacterias puede deberse a que los nemátodos transportan más de un tipo de bacteria, y alguna de ellas pueden ser letales para las larvas por si solas, actuando el nemátodo como un simple vector; de hecho la producción de nemátodos sufrió un importante retraso por la contaminación con *Serratia*, la cual también fue patogénica a las larvas de *Galleria mellonella*, esta bacteria no se descarta como posible causa de mortalidad en terreno, aparte de la propia simbionte del nemátodo (*Xenorhabdus bovienii*). En el caso de las larvas muertas por hongos, podría deberse a la mortalidad natural de las larvas producto de los hongos presentes en el suelo, los cuales pudieron expresarse con mayor intensidad en las parcelas sin nemátodos, debido a que existía una mayor población viva y receptiva al ataque de hongos del suelo, a diferencia de las parcelas tratadas con nemátodos donde un alto porcentaje fue muerta por este organismo de control. Otra posibilidad es que la bacteria simbionte del nemátodo se caracteriza por producir antibióticos, lo cual disminuye el parasitismo por otros organismos oportunistas existentes en el suelo, como podrían haber sido los hongos entomopatógenos detectados en las parcelas sin aplicaciones de nemátodos.

5.9.2. Huerto de Purranque.

Los resultados de este ensayo (Figura 14) fueron similares a los observados en Villarrica, la mayor mortalidad de larvas con nemátodos fue en aquellas parcelas tratadas con Qu-N820 (67%) y estadísticamente diferente al tratamiento control (P= 0,001), seguido de aquellas larvas muertas por bacterias (33%) con una diferencia estadística del control de P= 0,03. También fue coincidente la mayor mortalidad por

hongos (21%) en aquellas parcelas sin aplicación de nemátodos (P= 0,04). Las razones para estos resultados son los mismos indicados en el ensayo anterior.

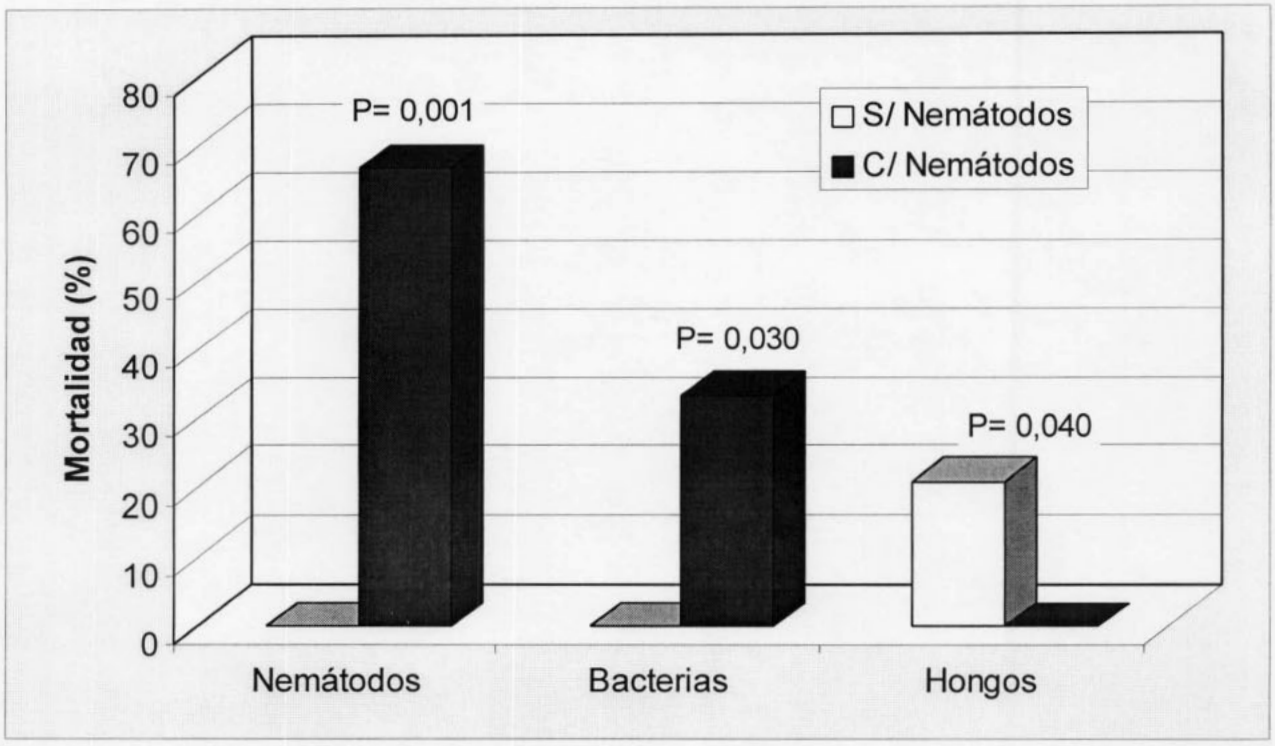


Figura 14. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* de suelos tratados con nemátodos *Steinernema* sp (Qu-N820). Ensayo de Purranque.

5.9.3. Huerto Freire.

Al igual que en los ensayos anteriores, se observó una alta mortalidad (80,8%) por nemátodos Qu-N820 en aquellas parcelas que fueron tratadas con este organismo, difiriendo significativamente (P< 0,001) de aquellas que no llevaron aplicación de nemátodos (Figura 15). En el caso de las larvas muertas por bacterias, no existió diferencia estadísticas (P= 0,109) entre ambos tratamientos, aunque si una tendencia a mostrar mayor mortalidad en aquellos tratamientos con nemátodos. Respecto a la mortalidad por hongos, se observó un 22% de larvas muertas y cuyo valor fue estadísticamente diferente (P= 0,002) al tratamiento control. Las razones para estos resultados ya fueron mencionadas para el ensayo de Villarrica.

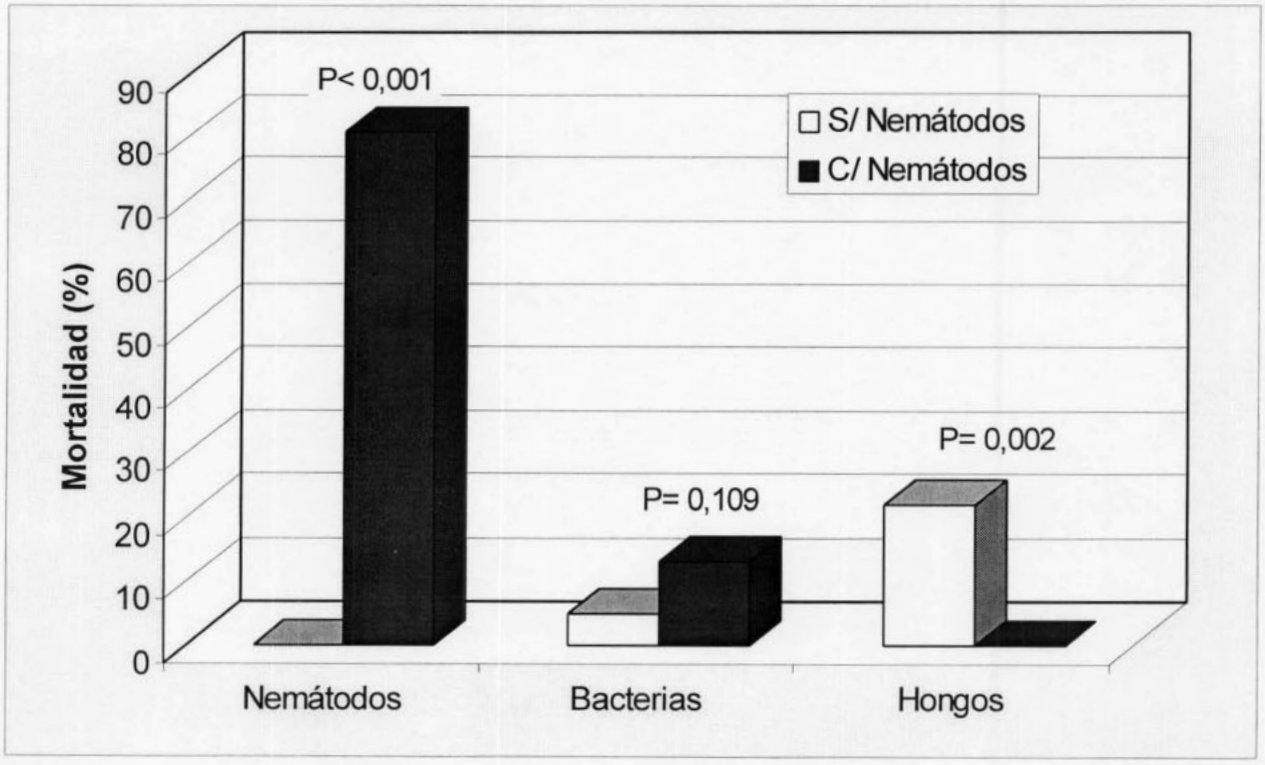


Figura 15. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* de suelos tratados con nemátodos *Steinernema* sp (Qu-N820). Ensayo de Freire.

5.10. Ensayos en terreno con nemátodos. Efectividad del control de cabritos.

5.10.1. Huerto de Freire.

Las curvas de captura de adultos indicaron que luego de 104 días se produjo una diferencia de 67,8% a favor de la parcela tratada con nemátodos. El promedio de 12 trampas por tratamiento, indicó una captura de adultos en las parcelas testigos de 9,33 ejemplares por m^2, mientras que las tratadas con nemátodos llegaron a 3,0 adultos por m^2 (Figura 16). Las primeras emergencias de adultos se registraron a partir del 28 de octubre del 2002 y se mantuvieron emergiendo hasta el 13 de enero del 2003; 75 días después de la primera captura en las trampas testigos. Los insectos capturados correspondieron al capachito de los frutales (*Asynonychus cervinus*), el cual se alimenta de raicillas cuando es larva y de hojas como adulto.

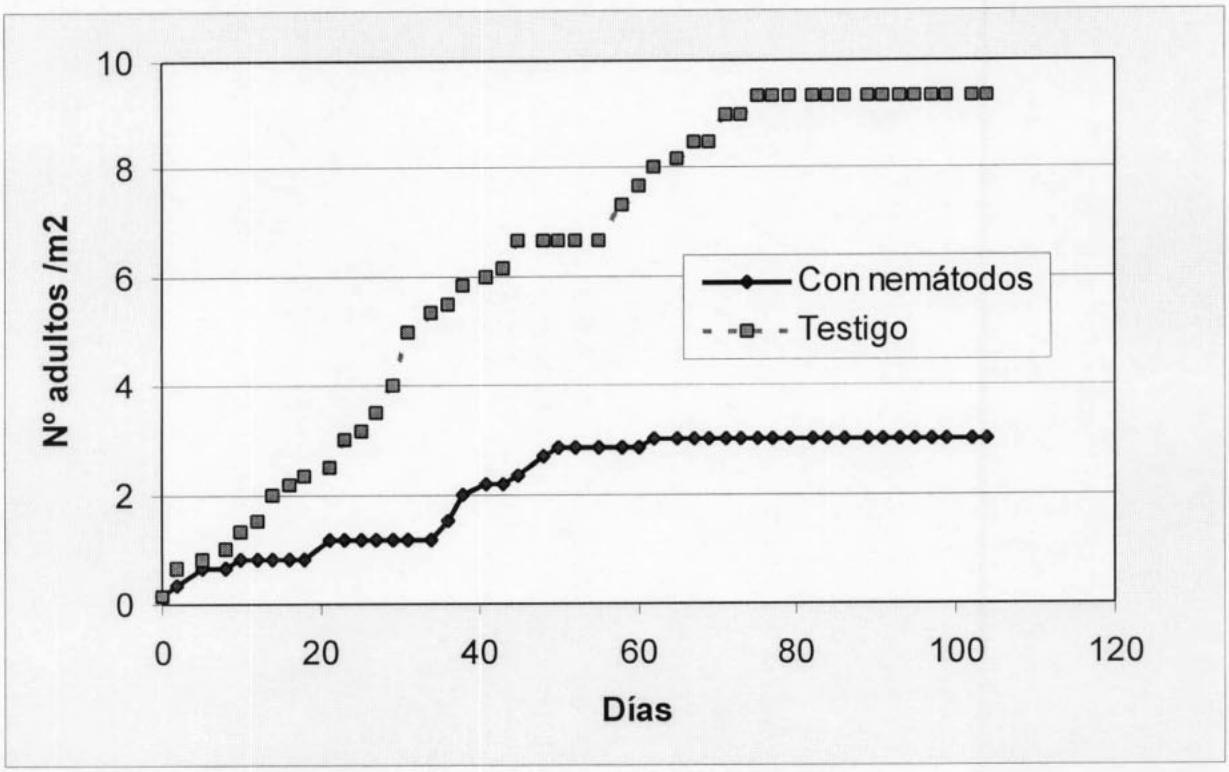


Figura 16. Efecto en la emergencia de adultos de *Asynonychus cervinus* desde plantas de arándanos tratados con nemátodos *Steinernema* sp. (Qu-N820). Ensayo de Freire.

5.10.2. Huerto de Villarrica.

Las curvas de captura de adultos indicaron que luego de 107 días se produjo una diferencia de 74,8% a favor de la parcela tratada con nemátodos. El promedio de 8 trampas por tratamiento, indicó una captura de adultos en las parcelas testigos de 70,5 ejemplares por m^2, mientras que las tratadas con nemátodos llegaron a 17,8 adultos por m^2 (Figura 17). Las primeras emergencias de adultos se registraron a partir del 30 de octubre del 2002 y se mantuvieron emergiendo hasta el último día de colecta: 12 de febrero del 2003; 105 días después de la primera captura en las trampas testigos. Los insectos capturados correspondieron al gorgojo de los invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus*), el cual se alimenta de raicillas y corteza de raíces cuando es larva y de hojas como adulto. Este insecto es partenogenético, por lo cual el aumento de la población es exponencial, bastando un solo individuo para iniciar una infestación de proporciones.

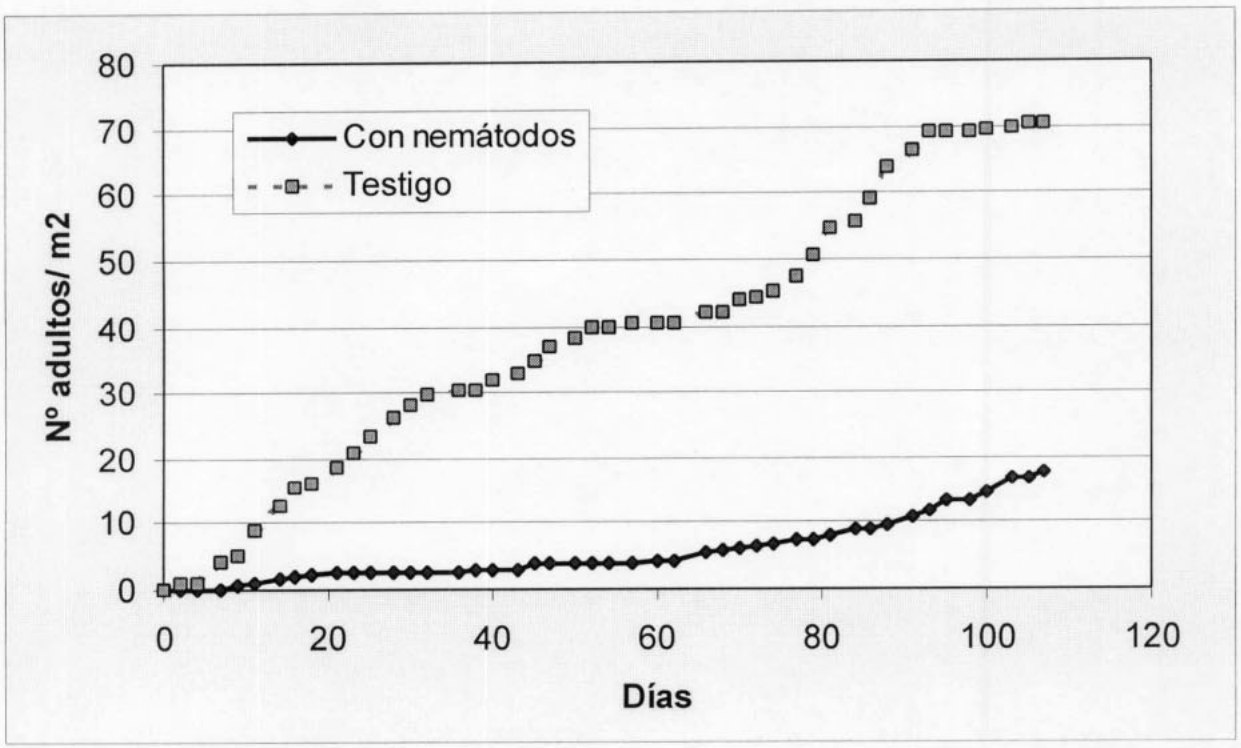


Figura 17 Efecto en la emergencia de adultos de *Ottiorhynchus sulcatus* desde plantas de arándanos tratados con nemátodos *Steinernema* sp. (Qu-N820). Ensayo de Villarrica.

5.10.3. Huerto de Purranque.

Las curvas de captura de adultos indicaron que luego de 93 días se produjo una diferencia de 62,6% a favor de la parcela tratada con nemátodos. El promedio de 8 trampas por tratamiento, indicó una captura de adultos en las parcelas testigos de 68,25 ejemplares por m^2, mientras que las tratadas con nemátodos llegaron a 25,5 adultos por m^2 (Figura 18). Las primeras emergencias de adultos se registraron a partir del 11 de noviembre del 2002 y se mantuvieron emergiendo hasta el 8 de febrero del 2003; 89 días después de la primera captura en las trampas testigos. Los insectos capturados correspondieron al gorgojo de los invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus*), el cual se alimenta de raicillas y corteza de raíces cuando es larva y de hojas como adulto.

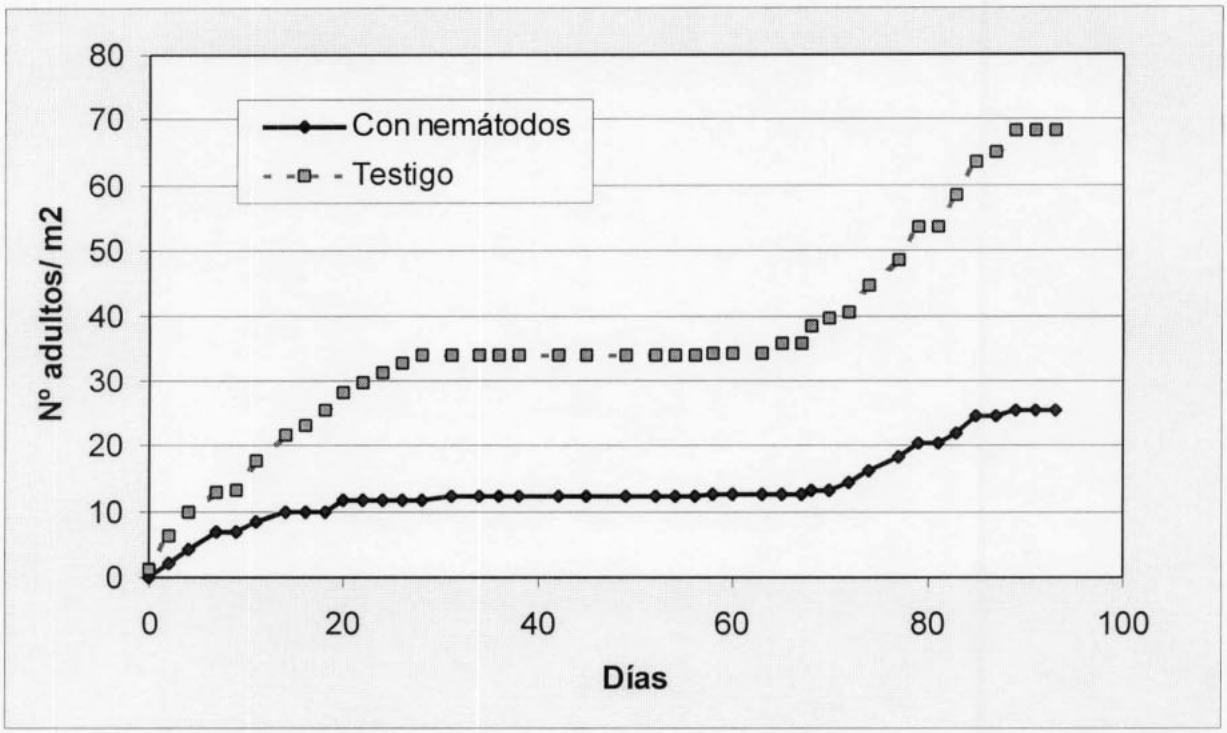


Figura 18. Efecto en la emergencia de adultos de *Ottiorhynchus sulcatus* desde plantas de arándanos tratados con nemátodos *Steinernema* sp. (Qu-N820). Ensayo de Purranque.

5.10.4. Huerto de La Unión.

Las curvas de captura de adultos indicaron que luego de 154 días se produjo una diferencia de 71,6% a favor de la parcela tratada con nemátodos. El promedio de 20 trampas por tratamiento, indicó una captura de adultos en las parcelas testigos de 80,0 ejemplares por m^2, mientras que las tratadas con nemátodos llegaron a 22,8 adultos por m^2 (Figura 19). Las primeras emergencias de adultos se registraron a partir del 4 de noviembre del 2002 y se mantuvieron emergiendo hasta el 17 de marzo del 2003; 133 días después de la primera captura en las trampas testigos. Los insectos capturados correspondieron al cabrito de la frambuesa (*Aegorhinus superciliosus*), el cual se alimenta de raicillas y corteza de raíces cuando es larva y de la corteza de los tallos como adulto.

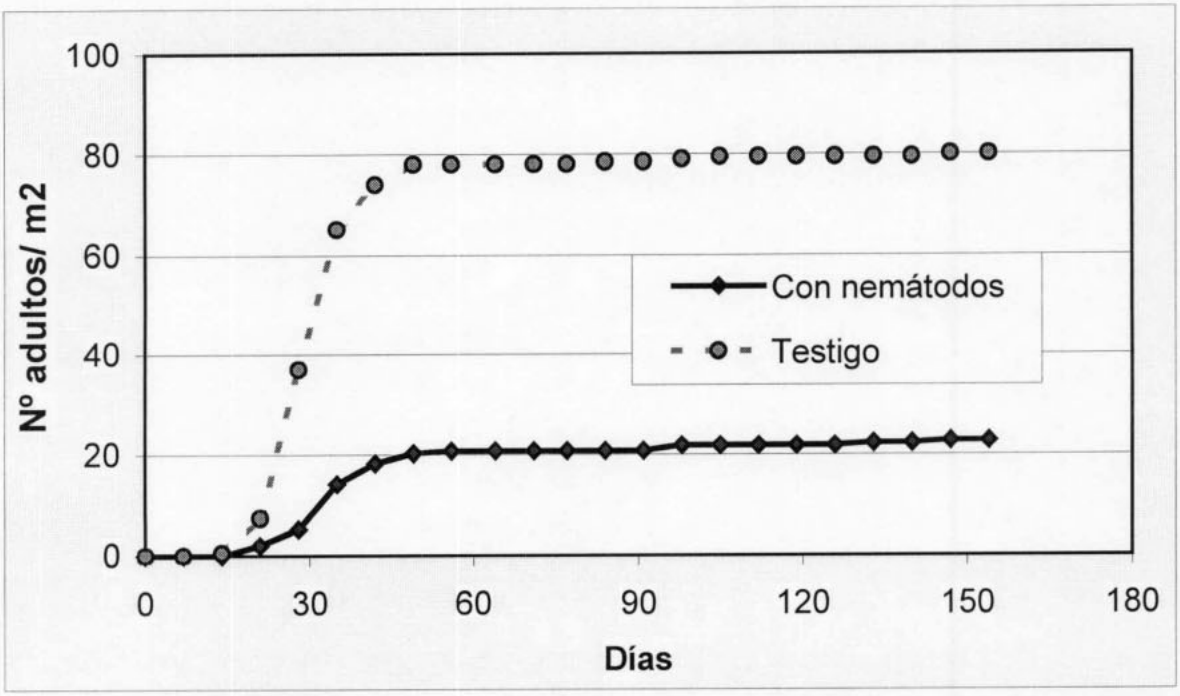


Figura 19. Efecto en la emergencia de adultos de *Aegorhinus superciliosus* desde plantas de frambuesa tratados con nemátodos *Steinernema* sp. (Qu-N820). Ensayo de La Unión.

En resumen, luego de una temporada de uso de los nemátodos entomopatógenos, éstos lograron disminuir en un 69,2% las poblaciones de los insectos evaluados, fluctuando entre 62,6 y 74,8% (Cuadro 7). Esta disminución ocurrió indiferente de la época de aplicación, ya que dos localidades tuvieron aplicaciones de invierno y las otras dos en primavera. Además, se logró el control de tres especies diferentes de curculionidos, todas las cuales tienen importancia cuarentenaria y para el cultivo de frutales menores.

Cuadro 7. Lugares, fecha de aplicación y control de insectos con nemátodos Qu-N820.

Localidad	Fecha aplicación	Especie de insecto	Nº de adultos/m2		Diferencia (%)
			Sin control	Con nemátodos	
Freire	18/6/02	*Asynonychus cervinus*	3,0	9,3	67,8
Villarrica	1/10/02	*Otiorhynchus sulcatus*	70,5	17,8	74,8
Purranque	17/5/02	*Otiorhynchus sulcatus*	68,3	25,5	62,6
La Unión	8/10/02	*Aegorhinus superciliosus*	80,0	22,8	71,6

5.11. Efecto de los hongos entomopatógenos en adultos de cabritos.

Todos los hongos y sus combinaciones produjeron 100% de mortalidad al cabo de 16 días de evaluación, a diferencia del testigo que solo alcanzó un 14%. Sin embargo,

aquellos tratamientos que llevaron el hongo Qu-B323 fueron los que mostraron un mayor progreso en la mortalidad y alcanzaron antes el 100% que las otras combinaciones de hongos (Figura 20).

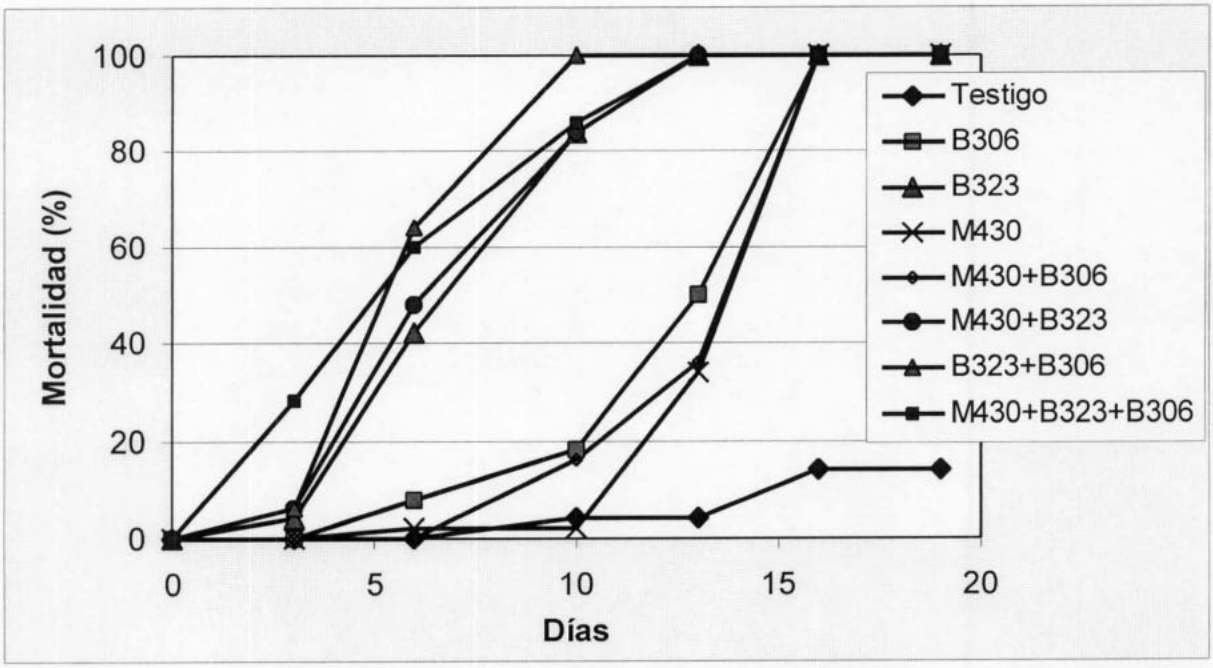


Figura 20. Mortalidad a través del tiempo de adultos de *Aegorhinus superciliosus* tratados con diferentes combinaciones de hongos entomopatógenos. Aplicaciones realizadas en torre de Potter con dosis equivalentes a 10^{12} esporas/ha.

Al comparar las áreas bajo la curva del progreso de la mortalidad, el análisis de varianza indicó que existían diferencias estadísticas ($P<0,001$). Todos los aislamientos fueron superiores al testigo y entre los aislamientos se diferenciaron aquellos que contenían el hongo Qu-B323, ya sea solo o en combinación con otros aislamientos (Figura 21). Este aislamiento corresponde al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, el cual fue colectado por el programa de Patología de Insectos de INIA Quilamapu en río Chaca, I región. Por consiguiente, Qu-B323 se confirma como un hongo efectivo para el control de adultos a dosis comerciales de 10^{12} esporas/ha, restando por confirmar su efectividad en terreno.

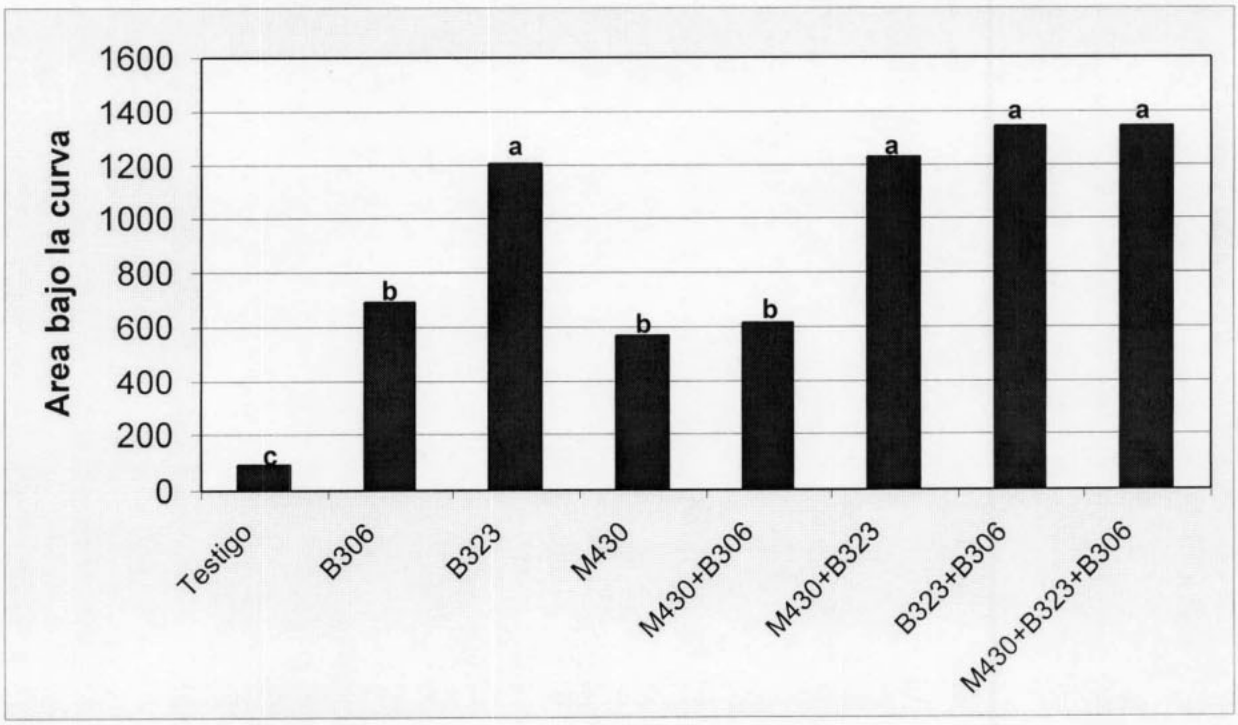


Figura 21. Area bajo la curva del progreso de la mortalidad de diferentes combinaciones de aislamientos de hongos entomopatógenos inoculados en adultos de *Aegorhinus superciliosus*.

6. FICHAS TÉCNICAS

La tecnología de producción de nemátodos pasa por masificar estos organismos para logra economías de escala. Dentro de los posibles métodos de producción el mas económico es la producción en grandes fermentadores, donde se pueden logra concentraciones de hasta 100.000 individuos /mL. Este tipo de tecnología no esta disponible en nuestro país, en consecuencia durante el desarrollo del trabajo y para poder realizar las pruebas de campo, se efectuaron contactos con la empresa española IDEBIO, ubicada en Salamanca, para la multiplicación del nemátodo Qu-N820 y su bacteria simbionte. Previa autorización del SAG, ambos organismos fueron enviados a IDEBIO, donde se produjeron en forma masiva, previo establecimiento de estándares de producción en fermentadores de 20 litros, para posteriormente escalar a fermentadores de 400 litros. También se realizó formulación de nemátodos en matriz de arcilla y reintroducción a Chile del material formulado (Foto 15). Estos nemátodo formulados han sido aplicados en los campos afectados con cabritos, dentro de las actividades de aplicaciones de campo (Fotos 19 y 20).

Lamentablemente, el proceso y costos de producción de nemátodos en fermentadores es parte del secreto industrial de la empresa, por lo cual no es posible incluir costos de producción y costos finales de producto comercial, al menos hasta la fecha de este informe. Sin embargo, se encuentra previsto que esta empresa Idebio instale una sucursal en Chile, durante el 2004, para la producción de nemátodos y en particular de la cepa Qu-N820.

Otras fichas técnicas que produjo el proyecto se encuentra en los Anexos A, B, C, D, E y F.

7. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Al inicio del proyecto el principal problema fue la tardanza con que se comenzó el trabajo, el huerto originalmente considerado para los trabajos de campo y colecta de insectos, fue oficialmente entregado por el agricultor el 1º de diciembre, fecha muy tardía para realizar un manejo agronómico adecuado de las frambuesas que existían en el lugar. Además, el huerto fue abandonado debido al severo daño que había recibido por los cabritos, en consecuencia no existió preocupación por los riegos, fertilización, control de malezas y otras prácticas culturales.

Al momento de recepcionar el huerto, el ataque de cabritos era intensivo y las malezas cubrían por completo las plantas, las que agravadas por la falta de agua, presentaban un estado terminal. Tal deplorable aspecto se trató de revertir mediante riegos semanales, fertilización y aumentando las labores de control de malezas. Sin embargo, y pese al esfuerzo desplegado, el huerto fue definitivamente abandonado, ya que nunca se pudo comprometer el agricultor a realizar las labores de mantención, y para el proyecto resultaba fuera de presupuesto mantenerlo a distancia. Lo anterior fue suplido con otros huertos de frambuesa y arándanos que compensaron el original.

Otro problema fue el no lograr la crianza artificial de cabritos, lo cual limitó la disponibilidad de larvas y adultos para trabajar durante el período invernal. Aparentemente, el éxito de una crianza artificial de *Aegorhinus superciliosus* resultó mas complejo de lo que inicialmente se presupuestó, quedando varías incógnitas por resolver antes de lograr una producción exitosa.

Durante el desarrollo de la crianza artificial de nematodos, ocurrió la contaminación de la colonia de crianza, producto de bacterias ajenas a la simbiosis Steinernema - Xenorhabdus, lo anterior se comprobó mediante la identificación de muestras de bacterias aisladas desde juveniles de nemátodos. El análisis de muestras identificó como principal organismo contaminante a la bacteria *Serratia marcescens*, la cual se describe en la literatura como contaminante en las crianzas artificiales de insectos y que también es reportada como causante de infecciones intrahospitalarias, afectando principalmente el sistema respiratorio. Debido a lo peligroso que pudiera ser esta contaminación, se procedió a eliminar la totalidad de la población de nemátodos Qu-N820 multiplicados en el laboratorio, con el consiguiente retraso que esto significó para el avance del proyecto.

8. CALENDARIO DE EJECUCIÓN

8.1. Ejecución de actividades. La comparación entre actividades programadas y ejecutadas se presenta en el Cuadro 8, de acuerdo a las actividades propuestas en el proyecto.

Cuadro 8. Comparación entre actividades programadas y ejecutadas.

Nº	Actividad	Fecha		Observaciones
		programada	ejecutada	
1	Colecta de larvas y adultos de *A. superciliosus*.	10-12/00	12/00-	Actividad retrasada por inicio del proyecto.
2	Crianza de larvas y adultos de cabrito de los frutales en laboratorio.	11-12/00	12/00-	Actividad atrasada debido a la demora en el inicio del proyecto.
3	Masificación de nemátodos entomopatógenos.	11-12/00	12/00-	Actividad en desarrollo.
4	Colecta de larvas y adultos de *A. superciliosus*.	01-12/01	01-12/01	Colecta entre enero y marzo, para iniciarse en octubre de cada año.
5	Crianza de larvas y adultos de cabrito de los frutales en laboratorio.	01-12/01	01-12/01	Las colectas se realizaban desde octubre a marzo de cada año.
6	Masificación de nemátodos entomopatógenos.	01-12/01	01-12/01	Actividad en desarrollo.
7	Evaluación y selección de nemátodos entomopatógenos.	01-10/01	12/00-10/01	Sin observación.
8	Pruebas de efectividad de los nemátodos seleccionados en microparcelas.	11-12/01	04-12/02	Actividad se retrasa para obtener mayor cantidad de inóculo.
9	Pruebas de dosis y tiempo letal.	12/01	04/12/02	Actividad se retrasa para obtener mayor cantidad de inóculo.
10	Informes de avance.	04 y 10 /01	04 y 10 /01	Sin observación.
11	Actividad de transferencia	11/01	-	Postergada para reunir mayores antecedentes.
12	Colecta de larvas y adultos de *A.. superciliosus*.	01-12 /02	01-12 /02	Colecta se realiza entre enero y marzo, para reiniciarse en octubre de cada temporada.
13	Crianza de cabrito de los frutales en laboratorio.	02-12/02	02-12/02	Logro parcial, la crianza no se estableció.
14	Masificación de nemátodos entomopatógenos.	01–12 /02	01–12 /02	Actividad permanente durante el año.
15	Pruebas de efectividad de los nemátodos seleccionados.	04-12 /02	04-12 /02	Sin observación.
16	Pruebas de dosis y tiempo letal.	04-12 /02	04-12 /02	Actividad se cumple parcialmente y en macetas.
17	Persistencia de nemátados a la deshidratación y rayos UV.	10-12/02	10/02-09/03	La actividad no se cumple.
18	Informes de avance	04 y 10 /02	04 y 10 /02	Sin observaciones.
S/nº	Evaluación de hongos		01-12/02	Actividad no programada

	entomopatógenos en terreno			originalmente en el proyecto.
19	Actividades de transferencia	11/02	11-12/02	Seminarios en Raihuen (VII región) y Remehue (X región).
20	Participación en seminarios	10/02	6/03	Actividad se retrasa para tener mayor cantidad de información.
21	Error de tipeo no asignó actividad a este número	-	-	-
22	Crianza de larvas y adultos de cabrito en laboratorio.	01-4 /03	01-4 /03	Actividad se realiza en laborat. de INIA Quilamapu y Remehue.
23	Masificación de nemátodos entomopatógenos.	01–08/03	01–08/03	Actividad permanente hasta el término del proyecto.
24	Determinar persistencia de los nemátados a la deshidratación y los rayos UV.	01-03 /03	10/02-09/03	La actividad no se cumple.
25	Evaluación de campo de las aplicaciones.	01-11 /03	01/03-	Actividad aun en desarrollo.
26	Informes de avance	04 y 10 /03	04 y 10 /03	Sin observaciones.
27	Actividad de transferencia	06/03	6/03	Presentación en 8° Siconbiol, Brasil.
28	Asistencia a Congresos	10/03	10/03	Presentación en 54° Congreso Agronómico de Chile.
29	Actividad de transferencia	01/04	-	Sin ejecutar.
30	Elaboración de informes	01/04	02/04	Sin observación.
31	Informe final	02/04	03/04	Sin observación.

8.2. Resumen de costos

El proyecto tubo un costo total de $95.353.150, de los cuales FIA realizó un aporte de $43.379.000 (45,5%). El Cuadro 9 presenta el resumen presupuestario de los montos originales y reales por parte de FIA y propios.

Cuadro 9. Resumen de aportes y gastos programados y reales.

ITEM	APORTE FIA			APORTE PROPIO			TOTALES		
	PPTO. $	GASTO $	SALDO $	PPTO. $	GASTO $	SALDO $	PPTO. $	GASTO $	SALDO $
Recursoso humanos	30,007,913	31,851,093	-1,843,180	45,509,656	45,509,656	0	75,517,569	77,360,749	-1,843,180
Equipamiento	372,232	166,643	205,589	3,450,000	3,450,000	0	3,822,232	3,616,643	205,589
Infraestruct.	0	0	0	3,014,494	3,014,494	0	3,014,494	3,014,494	0
Movilización, viátic, comb	1,848,458	1,021,889	826,569	0	0	0	1,848,458	1,021,889	826,569
Materiales e insumos	7,273,710	4,767,486	2,506,224	0	0	0	7,273,710	4,767,486	2,506,224
Difusión	696,687	0	696,687	0	0	0	696,687	0	696,687
Gastos generales	3,180,000	3,180,000	0	0	0	0	3,180,000	3,180,000	0
TOTAL	**43,379,000**	**40,987,111**	**2,391,889**	**51,974,150**	**51,974,150**	**0**	**95,353,150**	**92,961,261**	**2,391,889**

9. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Dentro del marco del proyecto se realizaron las siguientes actividades de transferencia:

- INIA Remehue (Osorno, X región): 27 de noviembre del 2003. Seminario FIA-INIA de "Control de burritos en berries"
- INIA Raihuen (Villa Alegre, VII región): 12 de diciembre del 2003. Seminario FIA-INIA de "Control de burritos en berries"

En ambas actividades participaron tres profesionales del proyecto, cuyos temas fueron los siguientes:
Ernesto Cisterna: Biología de las principales plagas en berries.
Andrés France: Uso de entomopatógenos para el control de plagas en berries.
Marcos Gerding: Principales resultados del proyecto FIA en control de curculionidos en berries.

Además, se efectuaron las siguientes presentaciones en Congresos científicos:

- FRANCE, A., M. GERDING and E. CISTERNA. 2003. Biological control of native curculionid larvae (*Aegorhynus superciliosus* and *Otiorhinchus sulcatus,* Coleoptera: Curculionidae) trough entomopathogenic nematodes in Chile. P. 80 abstract book 8º Symposium de Control Biológico SICONBIOL, Sao Pedro, Brasil. 22-26 de Junio.
- FRANCE, A y M. GERDING. 2003. Control del gorgojo de los invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus*) con nemátodos entomopatógenos nativos en arándanos. P. 39 Resúmenes 54º Congreso Agronómico de Chile, Torres del Paine, Magallanes, 9-10 de Octubre.

La presentación realizada en INIA Raihuen fue reporteada por el Diario El Centro, con fecha 23 de diciembre del 2002, suplemento Economía, página 12, titulado: Frambueseros se ponen al día en control biológico".

Las presentaciones se incluyen en el Anexo H.

10. IMPACTOS DEL PROYECTO

Este proyecto constituye el primer trabajo con nemátodos entomopatógenos nativos que se realiza en Chile. Anteriormente se habían usado nemátodos foráneos, y los cuales fueron descontinuados, tal es el caso de los trabajos de Dutky en 1957 y Vásquez en 1977. Dentro del control biológico el uso de nemátodos en Chile es una importante innovación en el control de plagas, dado por la posibilidad de usar un organismos móvil en el suelo, lo que permite alcanzar sectores y plagas que se encuentran ocultas y fuera de alcance para otras formas de control.

En efecto, el control de cabritos en frutales ha sido errático y deficiente mediante el control químico, obligando al uso continuo de grandes cantidades de pesticidas inyectados al suelo, con el consiguiente daño ambiental y a las personas. Tales prácticas no podrán ser utilizadas en una agricultura con trazabilidad y bajo impacto ambiental, por lo cual el tener una tecnología de control en base a nemátodos podrá garantizar un control en armonía con el medio ambiente y sin daño para los usuarios y consumidores.

El proyecto permitió evaluar también otros organismos de control, tales como los hongos entomopatógenos, los cuales pueden complementarse con el uso de nemátodos, especialmente para ayudar a reducir la presencia de adultos o como suplemento a las aplicaciones de nemátodos al suelo.

Producto de estos resultados, hoy en día existe una empresa que esta iniciando los estudios para producir nemátodos entomopatógenso en Chile, lo cual creará nuevas fuentes laborales y tecnología que no esta presente en el país. La dificultad de controlar en forma convencional este tipo de plagas y el aumento de la demanda por productos inocuos y sin restricción en los países consumidores de nuestra fruta, son los principales incentivos que permiten la instalación de ésta u otras empresas dedicadas a la producción de organismos de control biológico

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El proyecto permitió concluir lo siguiente:

- Existen nemátodos nativos que pueden controlas la plaga del Cabrito del Duraznero (*Aegorhinus superciliosus*). La cepa mas efectiva fue Qu-N820, la que en condiciones óptimas puede matar el 100% de las larvas al cabo de 10 días. Este mismo aislamiento demostró ser efectivo para otras plagas de curculionidos: el gorgojo de los invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus*) y el capachito de los frutales (*Asynonychus cervinus*), insectos tan importantes como el cabrito del duraznero.
- Estos nemátodos pueden movilizarse por el perfil del suelo y alcanzar una plaga subterránea como es la larva del cabrito. Este desplazamiento puede superar los 20 cm en pocos días, considerando el tamaño de la dauer del nemátodo (menos de 2 mm).
- Los ensayos en macetas demostraron que se puede aumentar en forma significativa la altura de plantas, peso seco de raíces y área foliar, al eliminar plagas como *Otiorhynchus sulcatus* con nemátodos.
- Aplicaciones de campo de nemátodos deben efectuarse durante los meses de otoño e invierno, evitando los meses mas calurosos, ya que las altas temperaturas y/o sequedad del ambiente no permitieron prosperar estos organismos en el suelo, al menos para las condiciones de la VIII región. Aplicaciones de invierno alcanzaron un 62,4% de control, mientras que las de verano un 38%.
- Ensayos en distintas localidades demostraron que los nemátodos permanecen en el suelo y se mantienen infectivos, al menos dentro de la temporada de aplicación.
- Dosis de 300.000 nemátodos/m^2, en huertos comerciales de frambuesa y arándano, pueden disminuir la emergencia de adultos dentro de la temporada en: 71% para *Aegorhinus superciliosus*, 68% para *Asynonychus cervinus* y 69% para *Otiorhynchus sulcatus*.
- Los nemátodos se pueden multiplicar in vivo, en larvas de lepidópteros y también en fermentadores, sin embargo esto último requiere de mayores conocimientos.
- También es factible utilizar hongos entomopatógenos nativos para el control del cabrito, tres cepas se destacaron dentro de un total de 20 aislamientos, por su patogenicidad y capacidad para esporular sobre el cadáver de los cabritos.
- Las mezclas de cepas de hongos logran mejorar el nivel de patogenicidad en adultos de cabritos, acortando los tiempos letales.
- Estos hongos logran sobrevivir en aplicaciones de campo, notándose que para el caso de *Beauveria* y *Metarhizium* se necesitan tres y dos aplicaciones, respectivamente, para mantener la presencia de estos hongos en el suelo.
- La crianza artificial de cabritos demostró ser compleja y lenta, en la práctica no se pudo acortar el ciclo normal de la plaga, incluso con temperaturas constantes. También se constató una gran mortalidad de huevos y larvas de primer estadío, lo que dificultó, al menos bajo las condiciones de la crianza, contar con una producción artificial de cabritos.

También, el desarrollo del proyecto permitió constatar que la plaga de cabritos esta aun en expansión, y que si se deja sin control es capaz de producir severas pérdidas económicas en varios frutales. Producto de la presión de la plaga, la fruticultura de la zona Centro Sur y Sur de Chile se vé seriamente amenazada en su expansión. Por consiguiente, este tipo de actividades y desarrollo de tecnología debiera ser estimulada y financiada. Lamentablemente, el estudio, desarrollo y producción de los nemátodos entomopatógenos es complejo, y un solo proyecto de este tipo es absolutamente insuficiente para formar conocimiento acabado sobre el tema. El desarrollo de la entomonematología debe continuar si se desea establecer como método de control de plagas en Chile, para lo cual se sugiere continuar estudios en aspectos de:

- Biología de los nemátodos y su bacteria simbionte
- Prospección de nuevas cepas y caracterización
- Evaluación del control en otras plagas de importancia económica
- Estudio de los metabolitos que producen las bacteria simbiontes, para uso agrícola o animal (Foto 22).
- Sistemas de producción masiva de nemátodos y su bacteria simbionte.
- Formulaciones para distintas situaciones.
- Estudios de ecología que permitan conocer cuales son las condiciones que permiten sobrevivir a los nemátodos y mantenerse activos para evitar futuras reinfestaciones de la plaga.

12. OTROS ASPECTOS DE INTERÉS

Originalmente el proyecto fue planteado para trabajar solo con nemátodos entomopatógenos, sin embargo durante el transcurso de éste se observaron la presencia de larvas de cabrito parasitadas con hongos, determinándose la presencia de *Beauveria* y *Metarhizium*, dos géneros de importancia en patología de insectos. Tres aislamientos (Qu-M430, Qu-B306 y Qu-B323) resaltaron por su efectividad en la mortalidad y esporulación sobre adultos de *Aegorhinus superciliosus*. Estos hongos no se contraponen al uso de nemátodos y podrían ser utilizados como complementos al control biológico estudiado en este proyecto. Sobre estos hongos se lograron producir formulados de tipo comercial, respaldando la posibilidad de producir estos organismos en grandes cantidades y formuladas de manera que se puedan comercializar y almacenar por un período superior a los 6 meses (Fotos 23 y 24). La tecnología de producción, formulación y almacenaje se esta desarrollando en conjunto con otro proyecto FIA denominado: Control biológico de la polilla del tomate (*Tuta absoluta*) mediante el uso de hongos entomopatógenos, y el que actualmente esta en curso.

Otro aspecto de interés fue que los resultados del control con nemátodos fueron aplicables a otras plagas de curculionidos, tanto o mas importantes que los cabritos, como es el caso de *Otiorhynchus sulcatus* (gorgojo de los invernaderos) y *Asynonychus cervinus* (capachito de los frutales), los cuales resultaron tan susceptibles al parasitismo de nemátodos como *Aegorhynus superciliosus*, logrando en promedio un 68% de menor emergencia de adultos cuando los nemátodos fueron aplicados en terreno (ver Cuadro 7).

13. ANEXOS

ANEXO A

TRAMPA PARA COLECTA DE NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS

(Woodring & Kaya, 1988)

MATERIALES

- Larvas de *Galleria mellonella* u otro Lepidóptero.
- Recipientes plásticos de 500 ml de capacidad.
- Muestras de suelo.
- Placas Petri estéril con disco reloj y papel filtro en su interior.
- Agua destilada y estéril.

METODOLOGIA

- Poner una capa de 1 a 2 cm de la muestra de suelo en el fondo de un recipiente.
- Colocar 4 a 5 larvas sobre la capa de suelo anterior.
- Completar el volumen del recipiente con el resto de la muestra de suelo, sin compactar.
- Incubar alrededor de 20 a 24 °C y obscuridad por 5 a 7 días.
- Colectar las larvas muertas o moribundas. Manchas amarillas, naranja, café o rojo ladrillo son indicaciones de un posible parasitismo y deben colocarse en la trampa de White. Larvas con coloraciones negras y mal olor deben ser eliminadas.
- Preparar la trampa de White poniendo un vidrio reloj cubierto con papel filtro dentro de una placa Petri, esterilizar en estufa por 30 min.
- Agregar unos 35 ml de agua destilada estéril al fondo de la placa Petri de manera de dejar en contacto con el papel filtro, no mojar el vidrio reloj.
- Colocar larvas sospechosas de estar infectadas sobre el papel filtro y ordenadas alrededor del borde del vidrio reloj.
- Lo anterior permite que los restos desintegrados de las larvas se muevan hacia el centro del vidrio reloj, mientras que los nemátodos escapan hacia la periferia y el depósito de agua del fondo.
- Una vez que los nemátodos comienzan a aparecer deben ser colectados diáriamente por 4 a 5 días, vaciando el agua con nemátodos en los frascos de cultivo plano y remplazando con agua fresca la placa Petri.
- Almacenar a 5 a 10 °C por 4 meses.

ANEXO B

MEDIO DE CULTIVO PARA NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS

INGREDIENTES

- 10 g de Peptona
- 10 g de Extracto de levadura
- 200 g de huevos
- 150 g de harina de soya
- 50 g de cebo de chancho
- 100 g de esponja
- 480 ml de agua desionizada o destilada

PREPARACION

- Picar la esponja en la jugera hasta lograr trozos menores de 2 cm.
- Disolver la peptona, extracto de levadura y harina de soya en el agua, calentando lentamente.
- Agregar la grasa de cerdo derretida.
- Los ingrediente anteriores y calientes se agregan a la esponja picada.
- Agregar los huevos a la mezcla, mezclando todo.
- Vaciar el medio-esponja en frascos hasta ½ volumen de su tamaño.
- Esterilizar en autoclave por 40 a 60 min..
- Guardar en frío (6ºC).

CULTIVO DE NEMATODOS

- Colectar nemátodos dauers desde la trampa de White.
- Lavarlos con agua de pozo estéril.
- Inocular frascos con la esponja embebida en el medio de cultivo.
- Incubar a 18ºC y obscuridad por aproximadamente 30 días o hasta que se observen abundantes nemátodos en las paredes del frasco.
- Para inducir dauers, la esponja con sus nemátodos son sacados a bandejas planas y lavados con agua de pozo estéril.
- Las bandejas se dejan incubando por otra semana a 18ºC y obscuridad.

ANEXO C

PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN DE LARVAS DE POLILLA DE LA CERA

(*Galleria mellonella*)

Ingredientes para dieta de *Galleria:*

100	ml	Agua destilada
420	g	Afrecho
350	ml	Melaza
200	g	Trigo molido
100	ml	Glicerina
5	ml	Polivit (polivitaminas)
0,30	g	Extracto levadura

Preparación:

Se disuelve la melaza en agua tibia, luego se agrega la glicerina y se mezcla bien, se deja enfriar la mezcla para agregar el Polivit. Una vez terminada la mezcla anterior, se incorporan los ingredientes secos (afrecho, trigo molido, extracto levadura), los que se incorporan y mezclan en forma manual.

Crianza de *Galleria:*

- Agregar a un contenedor provisto de tapa y ventilación en la parte superior, 200 gramos de la dieta.
- Depositar sobre la dieta 200 a 300 huevos recién ovipuestos sobre el medio, e incubar a 30°C.
- Incubar en ambiente seco y obscuridad. Las larvas alcanzarán el último instar en aproximadamente 4 a 5 semanas.
- Los adultos que emergen se anestesian con $C0^2$ o se enfrían en refrigerador, para poder manipularlos y trasladarlos a frascos con tapa.
- Se deposita un promedio de 50 individuos por frasco, en cuyo interior existe un papel encerado doblado como acordeón, el cual servirá como sitio de ovoposición.
- Los tres primeros días de ovipostura son los de mayor fertilidad en los huevos. Se puede dejar hasta por 5 días las polillas en el frasco.

ANEXO D

CRIANZA DE NEMÁTODOS IN VIVO

Método simple de producción in vivo de juveniles (dauers)

Parasitismo en disco Petri

Materiales

- Placa grande de 150 x 25 mm plástica
- Papel Whatman quality # 1
- 50 larvas de *Galleria mellonella*

Procedimiento

- Colocar dentro de la placa Petri 50 larvas de *Galleria mellonella*. Sobre éstas colocar el papel filtro y agregar sobre el papel una suspensión de 3 ml de nemátodos, con aproximadamente 2.500 juveniles por disco.
- Incubar a 25° C por 24 horas en oscuridad.

Producción en disco

Materiales:

- Sulfato de calcio (yeso)
- Placa Petri plástica de 100 x 15 mm
- Agua desionizada

Procedimiento

- Agregar de 20 ml de sulfato calcio por placa, en relación 1:1 con agua
- Secar al aire
- Dejar los cadáveres de larvas de *Galleria* sobre la placa con yeso seco.
- La placa con los cadáveres de *Galleria* se colocan dentro de otro disco de 150 x 25 mm, conteniendo éste 10 ml de agua desionizada.

- Colocar lo anterior dentro de una bolsa de esterilización, cerrar doblando el extremo de la bolsa y sujetando éste con un clips para evitar pérdida de humedad.
- Incubar a 25ºC por 7 a 9 días en oscuridad, periodo que demora el inicio de la migración de las larvas hacia el agua.
- Los juveniles que emigran al agua, se colectan diariamente.
- Agregar nuevamente agua y repetir esto por 16 días de cosecha.
- Los nemátodos colectados se almacenan en frascos de cultivo a 4° C en oscuridad

ANEXO E

MULTIPLICACIÓN MASIVA HONGOS ENTOMOPATOGENOS

Ingredientes:

100 gramos de cualquier cereal (trigo, avena, centeno, arroz).

80 mL de agua destilada.

Preparación:

- Esterilizar por 40 minutos los cereales dentro de frascos tipo conserveros.
- Una vez frío se inocula con 5 mL de suspención de esporas a una concentración de 10^7 conidias/mL.
- Se incuba en cámara de crecimiento por 8 días a 25ºC y un fotoperíodo de 12 horas luz.
- Una vez colonizado el substrato y esporulado, las esporas se extraen lavando los granos con agua.
- Se calcula la dosis de las esporas y se ajustan a concentraciones de aplicación equivalentes a 10^{12} conidias/ha.

ANEXO F

MÉTODOS DE CAPTURA DE ENTOMOPATOGENOS A TRAVES DE TRAMPAS DE SUELO (PARA *METARHIZIUM, BEAUVERIA* Y NEMATODOS)

- Colocar en la base de contenedor cilíndrico con tapa, seis larvas de *Galleria mellomella* de último estadío, cubrir éstas con suelo hasta el borde. Tapar el contenedor e incubar a 20°C en oscuridad, por un periodo de tres a cinco días, volteando los frascos diariamente.
- Al término de la incubación retirar las larvas del contenedor, que debieran estar vivas, y lavarlas con agua destilada.
- Colocar las larvas limpias en cámaras húmedas por separadas e incubar a 24°C en oscuridad.
- Observar por un periodo máximo de diez días o menor si aparecen síntomas de presencia de enemigos naturales.
- Comprobar la identificación de los organismos mediante cultivo en medios a base de agar si se trata de hongos o inoculación en larvas de *Galleria* si se trata de nemátodos.

ANEXO G

LISTADO DE PREDIOS, SUPERFICIES, ESPECIES, VARIEDADES Y FECHAS Y FORMA DE APLICACIÓN DE NEMATODOS Qu-N820.

Empresa	Ubicación geográfica	Especie	Variedad	Edad (años)	Estado Fenológico	Marco de plantación	Superficie tratada (ha)	Fecha aplicación	Forma aplicación
Agrícola Torrelaguna	Villarrica	Arándanos	Elliott	9	Post cosecha	3 x 0,75	2	21/04/03	Goteo
Soc. Agr. San Judas Tadeo	Freire	Arándanos	Elliott	2	Post cosecha	3 x 0,75	1.3	21/04/03	Goteo
German Sims San Román	Cachapoal	Frambuesas	Tulameenn	4	Receso vegetativo	3 x 0,25	1.5	19/05/03	Pulverizador
Soc. Agr. Santa Daniela	Negrete	Zarzaparrilla	Junnifer	5	Receso vegetativo	2,5 x 1	1	23/05/03	Surco
Inv. Hortisur S.A.	Los Angeles	Moras	Cherokee	15	Receso vegetativo	1 x 3	0.9	23/05/03	Surco
Serviplant	Purranque	Arándanos	Elliott	10	Post cosecha	2,5 x 1	0.25	22/04/03	Motobomba
Berries Patagonia	Purranque	Arándanos			Post cosecha	3 x 0,75	0.84	24/04/03	Goteo
Soc. Agr. Sagalu Ltda	La Unión	Frambuesas	Meecker	8	Receso vegetativo	3 x 0,25	1	23/04/03	Pulverizador
Berries Rio Bueno	Río Bueno	Arándanos	Blue Eyes	13	Post cosecha	3 x 0,75	1	22/04/03	Pulverizador
Agropecuaria Walker Prieto	Molina	Manzanas	Pink Lady	5	Receso vegetativo	3 x 2	1.1	30/05/03	Pulverizador

ANEXO H

ACTIVIDADES DE DIFUSION

PRESENTACION DE POSTER 8º SICONBIOL, BRASIL

" Biological control of native curculionid larvae (*Aegorhynus superciliosus* and *Otiorhinchus sulcatus,* Coleoptera: Curculionidae) trough entomopathogenic nematodes in Chile".

PRESENTACION DE EXPOSICIÓN EN 54º CONGRESO AGRONOMICO, CHILE.

"Control del gorgojo de los invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus*) con nemátodos entomopatógenos nativos en arándanos".

BIOLOGICAL CONTROL OF NATIVE CURCULIONID LARVAE (*Aegorhinus superciliosus* and *Otiorhynchus sulcatus* COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) WITH ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN CHILE.

GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

Andrés France, Marcos Gerding and Ernesto Cisternas.
INIA Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile.
afrance@quilamapu.inia.cl

INIA Quilamapu

INTRODUCTION

The native curculionids: *Otiorhynchus sulcatus* and *Aegorhinus superciliosus* are considered important pests due to the intensive damage caused by the larvae to different crops, such as pasture, cereals, and some bramble fruit trees. In the South of Chile the damage had been increasing considerably in the last years, specially in cash crops like blueberry and raspberry. The adults of both species rest during the day and activate at sunset, they feed from leaves (*O. sulcatus*, Figure 1A) or stem bark (*A. superciliosus*, Figure 1B), but such damages are economically worthless.

Figure 1. Adults of *Otiorhynchus sulcatus* (A), and *Aegorhinus superciliosus* (B) feeding on a raspberry.

The larvae of both insects produce extensive damages to the root system, by feeding from the hairy roots (*O. sulcatus*, Figure 2A) or from the root cortex (*A. superciliosus*, Figure 2B).

Figure 2. Root damage caused by larvae of *Otiorhynchus sulcatus* (A), and *Aegorhinus superciliosus* (B).

These root feeding produce unspecific foliage symptoms, that look like a generalized wilting and nutrient deficiencies (Figure 3).

Figure 3. Foliage symptoms caused by larvae of *Otiorhynchus sulcatus* and *Aegorhinus superciliosus* on blueberry (A) and raspberry (B) plants.

Raspberry and blueberry are important cash crops in the central and southern areas of Chile. They require high investment and intensive hand labour. A normal crop last for 12 to 15 years, however, the damage produced by *A. superciliosus* and *O. sulcatus* reduce the longevity to 4 or 5 years, with the consequently income reduction. The chemical control of such insects have been ineffective, due to the larvae remain far off the products. However, entomopathogenic nematodes can move along the soil profile looking for larvae, even inside the root system. Besides, the use the nematode avoid the application of toxic products that are affecting other soil animals.

The objective of this work was to evaluate the use of a Chilean entomopathogenic nematode (Qu-N820), in raspberry and blueberry orchards affected by *A. superciliosus* and *O. sulcatus*.

MATERIALS AND METHODS

Nematode selection. Six nematode isolates were evaluated against *A. superciliosus* larvae, these isolates were collected from central and south areas of Chile and identified as *Steinernema* spp. Nematodes were reared in *Galleria mellonella* larvae and only dauers were used as inoculum against *A. superciliosus*. Five larvae were inoculated with 50 nematode dauers per larva inside the Petri plate with filter paper. The larvae were incubated for 10 days in darkness and 21°C. Mortality was recorded daily. The experiment was a complete randomized with 5 replications. Mean comparison was performed at day 10 post inoculation, when the first isolate reached 100% of mortality, by using the Tukey test.

Greenhouse experiment. In order to evaluate the effectiveness of Qu-N820 in *O. sulcatus*, one year blueberry plants, cultivar Elliot, were planted in 20 cm diameter pots, inoculated previously with 5 *O. sulcatus* larvae. After 7 days different doses of dauer nematodes were applied on the pot surfaces by spraying the equivalent to 0; 100,000; 200,000 and 300,000 nematodes/m^2. The plants were kept in greenhouse and watered as needed. After 250 days the plants were removed from the pots, measured their size, root dry weight and leaf area.

The experiment consisted in 4 treatments with 10 replications, arranged in a complete randomized design. The results were compared through analysis of variance and Tukey test.

Field experiments. Isolate Qu-N820 was reared in *G. mellonella* larvae, and nematode dauers were collected through the White's tramp. Only dauers that emerged the first five days from the *G. mellonella* larvae were used as inoculum.

Two blueberry and one raspberry orchards naturally infected with *A. superciliosus* or *O. sulcatus* were used for field experiments (Table 1). Nematodes were applied at the end of the fall season by spraying the equivalent to 300.000 dauers/m^2 with a manual sprayer. The experimental units were 5 m^2 along the plant row. Only two treatments were considered en each locality, with and without nematodes. The experiments had a complete block design with 5 replications.

Table 1. Specie, cultivars and locations of the orchards used for field experiments.

Specie	Cultivar	Age (years)	Location
Blueberry	Brigtwell	9	Pucón
Blueberry	Elliot	9	Purranque
Raspberry	Meeker	8	La Unión

Furthermore, the emergency of adults was recorded during the summer. Two adult traps per plot were placed inside the experimental unit (Figure 4). Adult emergency was recorded every other day. An analysis of variance was performed with the baiting and emergency data, and mean comparisons were accomplished with the Tukey test.

Figure 4. Trap for adult emergency inside the experimental plot.

RESULTS

Nematode selection. *A. superciliosus* larvae mortality was recorded since two days of post inoculation. Isolate Qu-N820 produced the highest mortality rate (Figure 5) and 100% of mortality after 10 days, nevertheless isolates Qu-N21 and Qu-N620 were statistically similar. The control treatment did not show mortality.

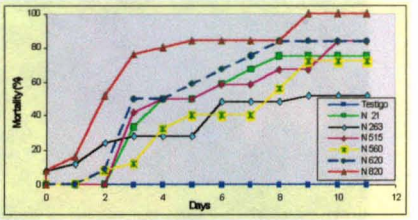


Figure 5. Mortality over time of *Aegorhinus superciliosus* larvae inoculated with different isolates of entomopathogenic nematodes.

Greenhouse experiment. Statistic differences were observed between the untreated control and the pots with nematodes, for plant size, root weight and leaf area (Figures 6). The treatments that did not received nematodes were the most affected, particularly the leaf area which was reduced by 80.5, 83.4 and 87.5% when was compared with the 100; 200 and 300,000 nematodes/m^2, respectively.

Figure 6. Blueberry plants inoculated with 5 *Othiorynchus sulcatus* larvae per pot and inoculated with 0; 100; 200 and 300,000 nematodes/m^2.

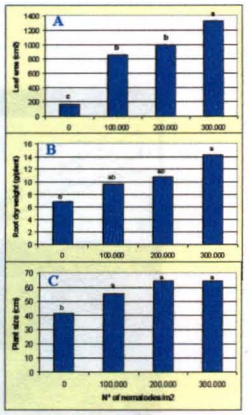


Figure 7. Effect of the nematode doses on leaf area (A), root dry weight (B) and plant size (C) of blueberry plants inoculated with 5 *Othiorynchus sulcatus* larvae per pot.

Field experiments. Adult emergency indicated statistic differences in the three localities and for both insect pests.

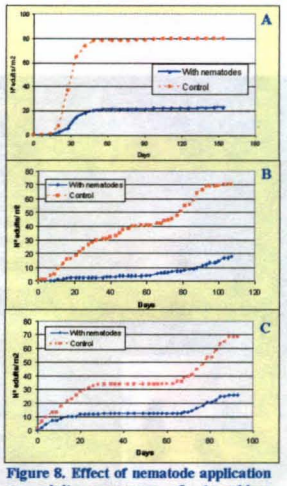


Figure 8. Effect of nematode application on adult emergency of *Aegorhinus superciliosus* (A), and *Othiorynchus sulcatus* in Pucón (B) and Purranque (C).

Overall, at the end of the adult emergencies, an average of 69.7% ($P<0.001$) of reduction was observed in the nematode treated plots, compared with the untreated ones, in the three localities. These reduction was detectable after 30 days of the beginning of *A. superciliosus* adult emergency and remain stable after day 49, indicating a single generation (Figure 8A). Instead, *O. sulcatus* showed two adult picks, ended at day 30 and 90 from the beginning of the emergency (Figures 8 B and C).

These significant reductions should affect the new insect generation and consequently the plant recovery, since most of the untreated plants render weak or dead plants.

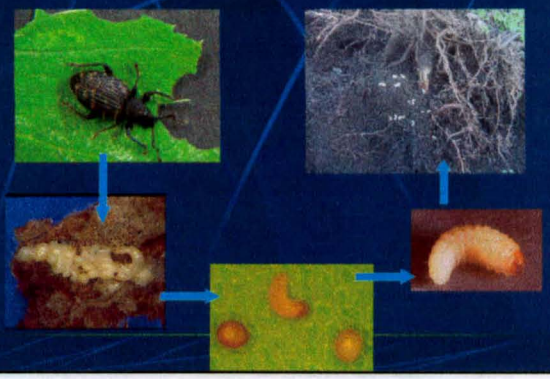
CONCLUSIONS

The nematode Qu-N820 (*Steinernema* sp.) was able to control two important insect pest (*Aegorhinus superciliosus* and *Otiorhynchus sulcatus*) in raspberry and blueberry crops. The lab, greenhouse and field experiments confirmed that the use of nematodes may reduce insect populations, allowing a subsequent plant recovering. In order to confirm these results large areas are been treated during these seasons (about 12 ha), to confirm the applicability and effectiveness of the control through entomopathogenic nematodes.

CONTROL DEL GORGOJO DE LOS INVERNADEROS (*Otiorhynchus sulcatus*) CON NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS EN ARÁNDANOS.

Andrés France y Marcos Gerding
INIA Quilamapu

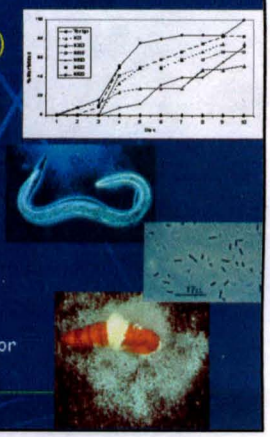
Ciclo de *Otiorhynchus sulcatus*



Daños producidos por *Otiorhynchus sulcatus*

Nemátodos entomopatógenos (NEP)

- Presentes en Chile.
- Steinernema sp (Qu-N820, de Puerto Cisne) fue patógeno a *O. sulcatus*.
- Vector de la bacteria entomopatógena *Xenorhabdus bovinii*.
- De hábito nictador y perseguidor
- Rápidos en matar (24-48 hrs.)

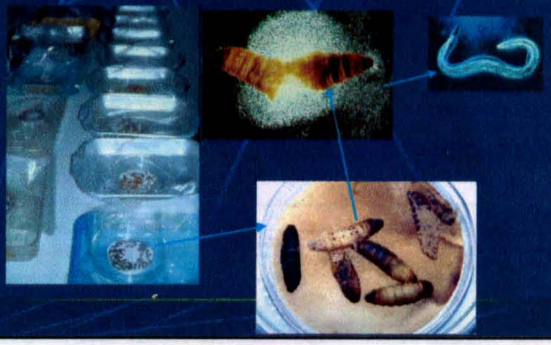


Objetivos

- Evaluar el control de las larvas de *Othirynchus sulcatus* mediante el uso del nemátodo entomopatógeno Qu-N820 (*Steinernema* sp.) en condiciones de invernadero y campo.
- Determinar el grado de daño que producen las larvas de *O. sulcatus* y el efecto del control con nemátodos.

Materiales y Métodos

- Producción y acondicionamiento de NEP



- Ensayos en macetas:
  - Var. Elliot de 2 años.
  - Una planta por maceta
  - 5 larvas por maceta.
  - 10 repeticiones

- Tratamientos (nemátodos/m²):
  - 0
  - 100.000
  - 200.000
  - 300.000

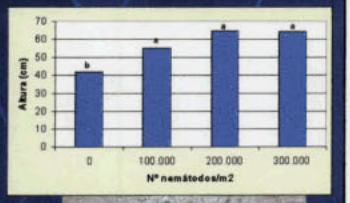
- Fechas:
  - Inoculación: 27 de junio
  - Evaluación: 3 de marzo

Resultados de ensayos en macetas

Efecto en:

- Altura de plantas

(prueba de Tukey)

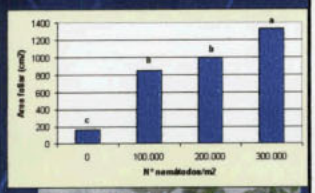


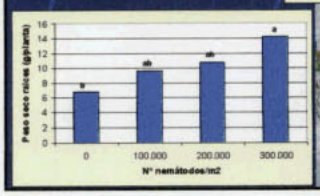
Resultados de ensayos en macetas

Efecto en:

- Área foliar
- Peso seco de raíces

(prueba de Tukey)

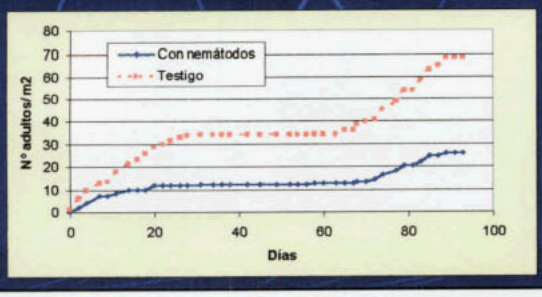




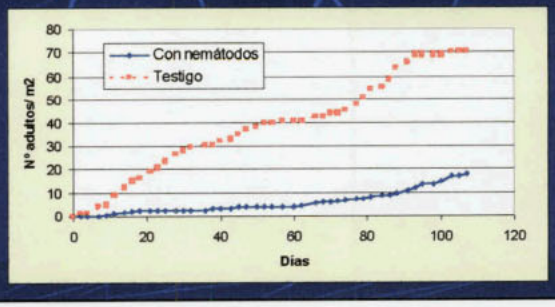
- Lugares de ensayos de campo:
  - Villarrica (IX). Agrícola Terrelaguna. var. Brigthwell de 9 años.
  - Purranque (X). Agrícola Gidding. var. Elliot de 9 años.

- Tratamientos:
  - Control
  - Con nemátodos (300.000 dauers/m²)
  - 8 repeticiones
- Evaluaciones:
  - Emergencia de adultos cada 2 ó 3 días
  - Determinación de curvas de captura.

Emergencia de adultos de *Otiorhynchus sulcatus* desde plantas de arándanos tratados o sin tratar con nemátodos *Steinernema* sp. (Qu-N820) Purranque



Emergencia de adultos de *Otiorhynchus sulcatus* desde plantas de arándanos tratados o sin tratar con nemátodos *Steinernema* sp. (Qu-N820) Villarrica



Comparación de emergencia de adultos de *Otiorhynchus sulcatus* desde plantas de arándanos tratados o sin tratar con nemátodos (Qu-N820)

Localidad	Fecha aplicación	Nº de adultos/m2		Diferencia (%)
		S/ nemátodos	C/ nemátodos	
Villarrica	01/10/02	70,5	17,8	74,8 *
Purranque	17/05/02	68,3	25,5	62,6 *
Promedio		69,4	21,7	68,7 *

* Diferencias estadísticas de acuerdo a prueba de Chi-cuadrado (P<0,001)

Conclusiones

- Los ensayos en macetas demostraron que el control de *Otiorhynchus sulcatus* con *Steinernema* Qu-N820 permitió aumentar en promedio un 48% la altura de plantas, 65% el peso seco de raíces y 483% el area foliar, comparado con un testigo sin control.
- El control en terreno permitió disminuir la emergencia de adultos en un promedio de 68,7% durante la temporada.
- Los resultados permiten estimar que es factible el control biológico de *Otiorhynchus sulcatus* mediante el uso del nemátodo nativo Qu-N820. Actualmente se encuentran 15 ha tratadas como ensayos demostrativos para ser evaluadas en la próxima temporada.

Frambueseros se ponen al día en control biológico

Un número cercano a los 40 productores de frambuesas de la Séptima Región conocieron aspectos sobre el control biológico aplicado a este tipo de cultivo destinado tanto al consumo interno pero, principalmente, de exportación, a través de un seminario taller realizado en Villa Alegre, en el centro de investigación "Raihuén", perteneciente al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.
Durante el encuentro se mostraron los avances del proyecto que fuera reiniciado el año 2001, que cuenta con el financiamiento de la Fundación de Innovación Agraria (FIA), y que tiene por finalidad colaborar con los agricultores en la necesidad de reducir el uso de productos químicos y, de esta manera, combatir los problemas que afectan a los frutales en forma más eficiente, mediante el control biológico adecuado.
Asimismo, se informó a los agricultores sobre criterios de producción limpia, control biológico y la disminución de productos químicos.
El taller, dirigido a productores, agricultores, técnicos ligados al área de los huertos de frambuesa de la Séptima Región fue dictado por ingenieros agrónomos e investigadores de la institución Ernesto Cisternas, Andrés France y Marcos Gerding.
El proyecto se extenderá hasta fines del año 2004.

La finalidad del proyecto del centro de investigación "Raihuén" es reducir el uso de productos químicos en la producción, además de la introducción de prácticas de producción limpia. Asimismo, la entidad llevará a cabo hoy la constitución del grupo de discusión permanente del proyecto de vitivinicultura de precisión

VITIVINICULTURA DE PRECISION

Asimismo, el centro de investigación "Raihuén" realizará hoy la reunión de constitución del grupo de discusión permanente del proyecto de "vitivinicultura de precisión".
Cabe señalar que en el año 1997 el INIA dio de nuevas tecnologías que pueden ser utilizadas para capturar y analizar información georeferenciada de una unidad de producción con el fin de aumentar la eficiencia en el manejo y mejorar el rendimiento de la calidad de los cultivos. Esta línea de investigación ha sido conformada por un equipo de investigadores de distintas especialidades que en su consión del INIA (ITAP).
Asimismo, en el año 2000, luego de tres años de investigación y transferencia en agricultura de precisión en cereales y remolacha, el INIA redefinió su estrategia de investigación y dirigió la línea hacia los cultivos industriales, los frutales y las vides, en consideración a los requerimientos de mayor rentabilidad que exige la gentina, Australia, Inglaterra y Estados Unidos ya poseen proyectos de investigación y desarrollo de la agricultura de precisión en cultivos tradicionales como trigo, soja, maíz y algodón.
Finalmente, en octubre del 2001, el FIA aprobó el financiamiento del proyecto de "Desarrollo de la Tecnología de Manejo Sitio Específico en Viñedos para mejorar la calidad de la uva a vinificar", el cual fue presentado por el ITAP para ser ejecutado en la Séptima Región durante el 2001 y 2005.

Se informó a los agricultores sobre criterios de producción limpia, control biológico y la disminución de productos químicos

ANEXO I

SECUENCIA FOTOGRÁFICA DE APLICACIONES COMERCIALES DE NEMÁTODOS EN TERRENO

Foto 1. Adulto de cabrito y su daño en la corteza.

Foto 2. Larvas de cabrito y su daño en la raíz.

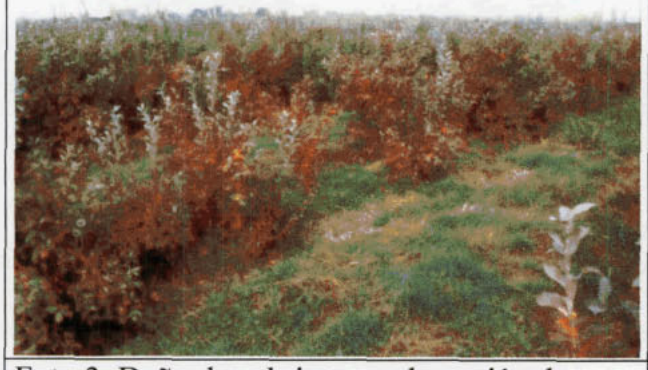


Foto 3. Daño de cabritos en plantación de arándanos.

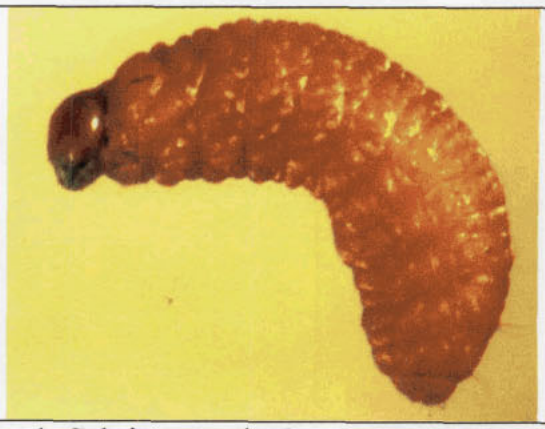


Foto 4. Cabrito parasitado por nemátodos, la larva se muestra hinchada y de color rojizo.

Foto 5. Larvas de cabrito usadas para ensayos.

Foto 6. Inoculación de larvas de *Galleria mellonella* con nemátodos.

Foto 7. Tubos utilizados para prueba de desplazamiento de nemátodos.

Foto 8. Vista parcial de ensayos de inoculación de suelo y trampas de captura.

Foto 9. Huevos y larva de primer estadío de cabrito.

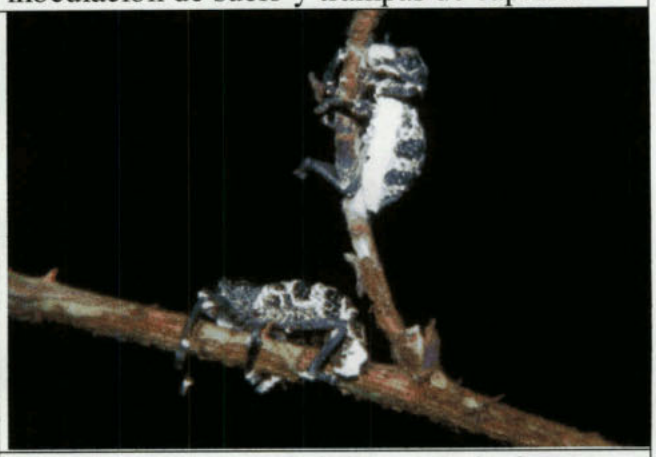


Foto 10. Adultos de cabritos parasitados por *Beauveria bassiana*.

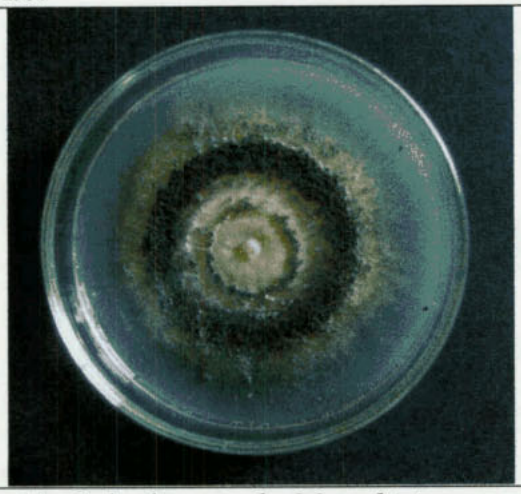


Foto 11. Colonia pura de *Metarhizium anisopliae*.

Foto 12. Trampa de captura de adultos de cabritos y otras plagas subterráneas.

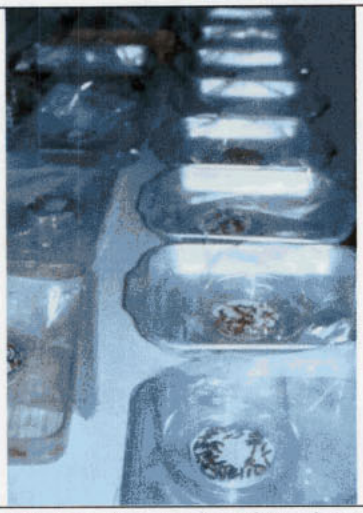


Foto 13. Sistema de producción de nemátodos *in vivo* mediante inoculación de *Galleria*.

Foto 14. Sistema de captura de nemátodos migratorios desde larvas inoculadas.

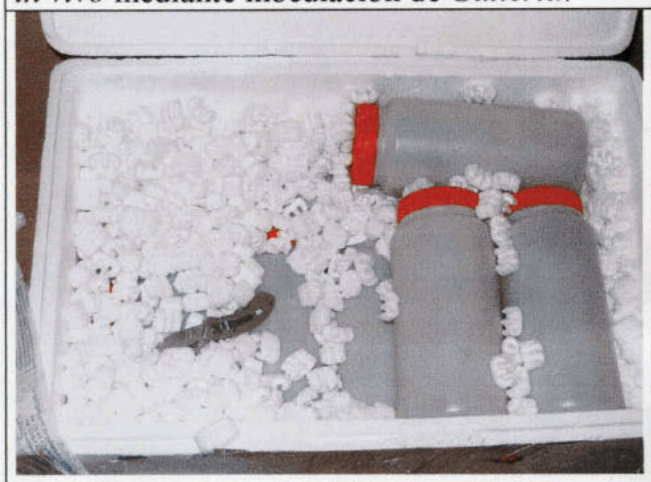


Foto 15. Envases con nemátodos formulados.

Foto 16. Dilución del formulado en agua.

Foto 17. Filtrado de nemátodos.

Foto 18. Vaciado a estanque de dosificación.

Foto 19. Aplicación en Berries Río Bueno.

Foto 20. Aplicación en Purranque.

Foto 21. Ensayos de control de *Otiorhynchus sulcatus* con nemátodos.

Foto 22. Producción de antibióticos por *Xenorhabdus* desplazando a otras bacterias.

Foto 23. Esporas de hongos formuladas al vacío.

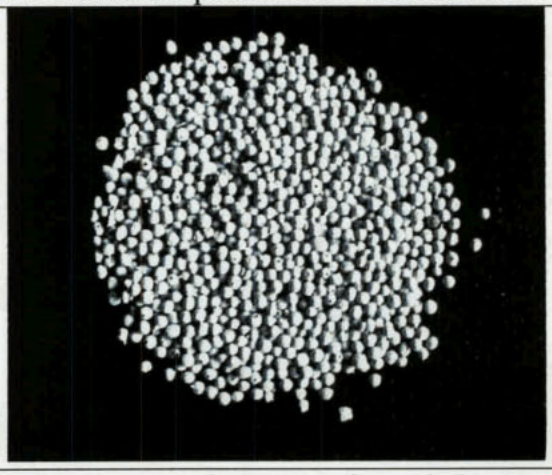


Foto 24. Esporas de hongos formuladas en pellets.

14. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Artigas, J. N. 1994. Entomología Económica. Ediciones Universidad de Concepción. 943 p.

Aguilera, A. 1988. Plagas del arándano en Chile. Pp. 110-133, in: Seminario "El cultivo del arándano". Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Carillanca. Temuco. Serie Carillanca N°2.

Akhurst, R. J. and M. E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of Xenorhabdus. Pp. 75-90, in: Entomopathogenic nematodes in biological control. R. Gaugler and H. K. Kaya, eds. CRC Press, USA. 365 p.

Bedding, R. A., R. J. Akhurst, and H. K. Kaya. 1993. Future prospects for entomogenous and entomopathogenic nematodes. Pp. 157-170, in: Nematodes and the biological control of insect pests. R. Bedding, R. Akhurst, and H. Kaya, eds. Csiro, Victoria, Australia. 178p.

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

González, H. 1989. Insectos y Acaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile. Universidad de Chile y BASF S.A. Chile. 310 p.

Ishibashi, N. and E. Kondo. 1993. Behavior of infective juveniles. Pp. 139-150, in: Entomopathogenic nematodes in biological control. R. Gaugler and H. K. Kaya, eds. CRC Press, Florida, USA. 365 p.

Kaya, H.; R. Bedding, and R. Akhurst. 1993. An overview of insect parasit and entomopathogenic nematodes. Pp: 1-10, in: Nematodes and the biological control of insect pests. R. Bedding, R. Akhurst and H. Kaya, eds. Csiro, Victoria, Australia. 178 p.

Pérez, H. 1994. Descripción de aspectos morfológicos, biológicos y de comportamiento de *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae). Tesis de Licenciado en Agronomía, Universidad Austral de Chile, Valdivia. 102 p.

Prado, E. 1991. Artrópodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Boletín Técnico N°169. Santiago, Chile. 207 p.

Vázquez, 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.

Woodring, J. L., and H. K. Kaya. 1988. Steinernema and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331. Arkansas Agric. Exp. Station, Fayetteville, Arkansas, USA. 30 p.

Wouts, W. M. 1991. Steinernema (Neoaplectana) and Heterorhabditis species. Pp 855-897, in: Manual of agricultural nematology. W. R. Nickle, ed. Marcel Dekker, New York, USA. 1035 p.