

Capítulo 4

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

Eduardo Tapia R.

Ing. Biotecnología, Dr.

etapia@inia.cl

1. Introducción

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

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

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



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

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

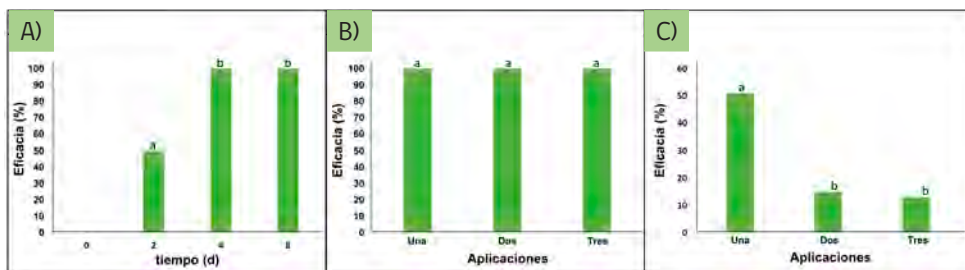


Figura 1. Eficacia de los experimentos en laboratorio, campo y áreas urbanas. A) Eficacia en laboratorio sobre pupas 8 días después de aplicadas (dda). B) Eficacia de aplicación sobre pupas en vides con infestación controlada en campo. C) Eficacia de aplicaciones en sectores urbanos infestados naturalmente.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

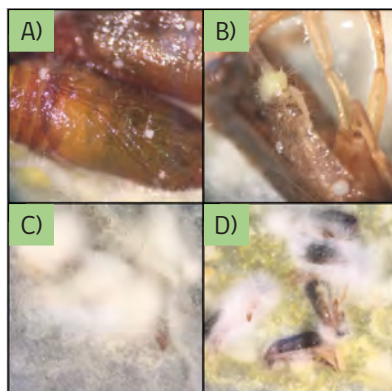


Figura 2. Evaluación en condición *in vitro* de *B. pseudobassiana* RGM 1747 formulada sobre pupas de *L. botrana* A) 25°C y 80% HR. A) y B) muestran la aplicación sobre pupas y polillas respectivamente, En ambos casos, los puntos blancos son microportadores del hongo entomopatógeno. C) y D), los resultados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

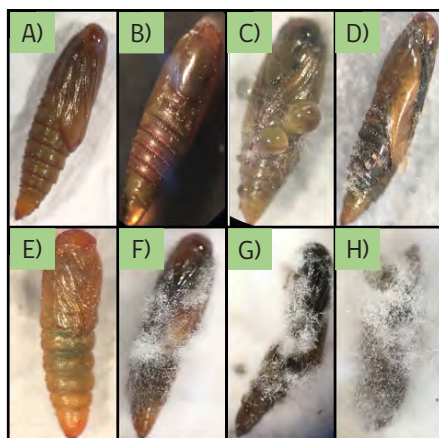


Figura 3. Evaluaciones de campo de formulación de *B. pseudobassiana* RGM 1747. Las fotografías desde la A) hasta la D) fueron tomadas de especímenes de campo expuestos a temperaturas promedio de 9,1°C y 78,3% de HR en Julio/2016. Las fotografías inferiores de E) hasta H) muestran el resultado de la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

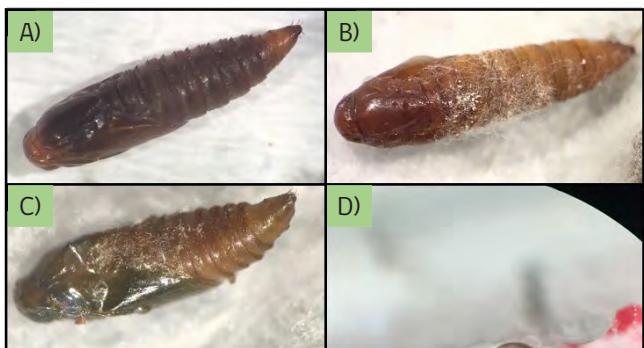


Figura 4. Eficacia en sectores urbanos del formulado de *B. pseudobassiana* RGM 1747 sobre pupas de *L. botrana* en condiciones de infestación natural. La temperatura promedio fue de 10,7°C con un 73,7% de HR en agosto de 2016. Las pupas fueron extraídas de su capullo para capturar las fotografías. A)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

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

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

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

2. Metodología general

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

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

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

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

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

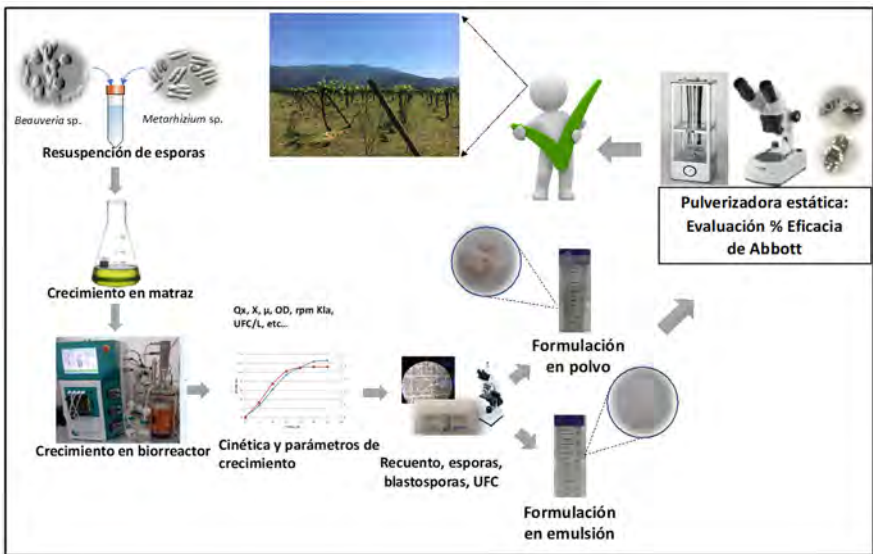


Figura 5. Esquema general de metodologías de trabajo del proyecto en: producción y evaluación de bioinsumos.

3. Resultados

3.1. Resultados de laboratorio, pulverizadora estática:

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

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

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

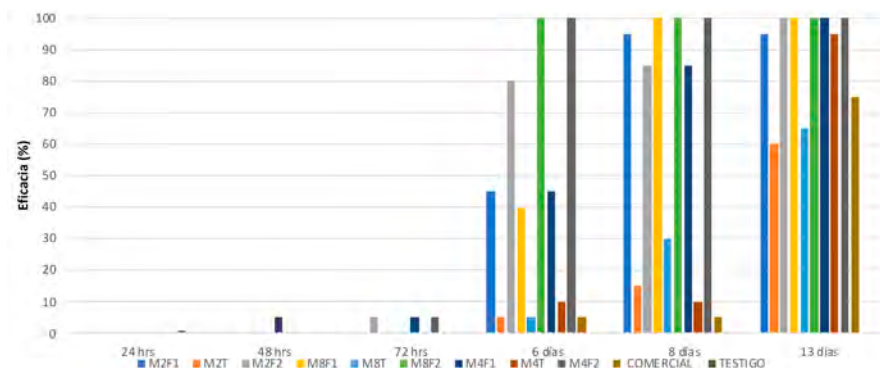


Figura 6. Eficacia de emulsiones inversas de *Metharizium* sobre pupas de *L. botrana* determinada por el método de Abbott. Cepa M2 tampón (M2T), cepa M2 formulado sin fuente de energía adicional (M2F1), cepa M2 formulado con fuente de energía adicional (M2F2), cepa M4 tampón (M4T), cepa M4 formulado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

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

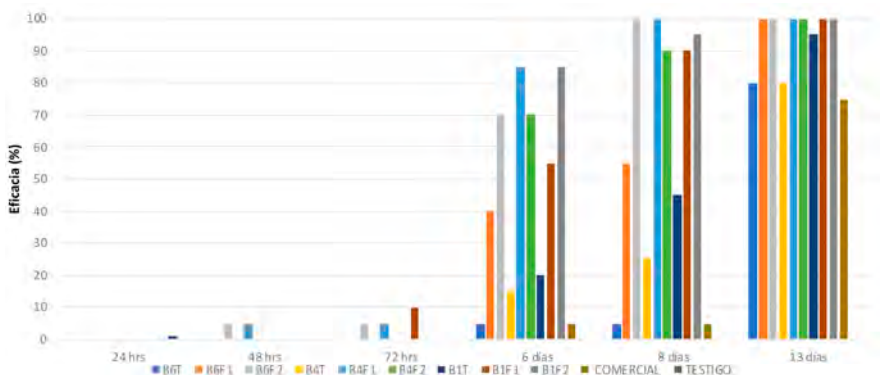


Figura 7. Eficacia de emulsiones inversas de *Beauveria* sobre pupas de *L. botrana* determinada por el método de Abbott. cepa B1 Tampón (B1T), cepa B1 Formulado sin fuente de energía adicional (B1F1), cepa B1 formulado con fuente de energía adicional (B1F2), cepa B4 tampón (B4T), cepa B4 formulado sin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

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

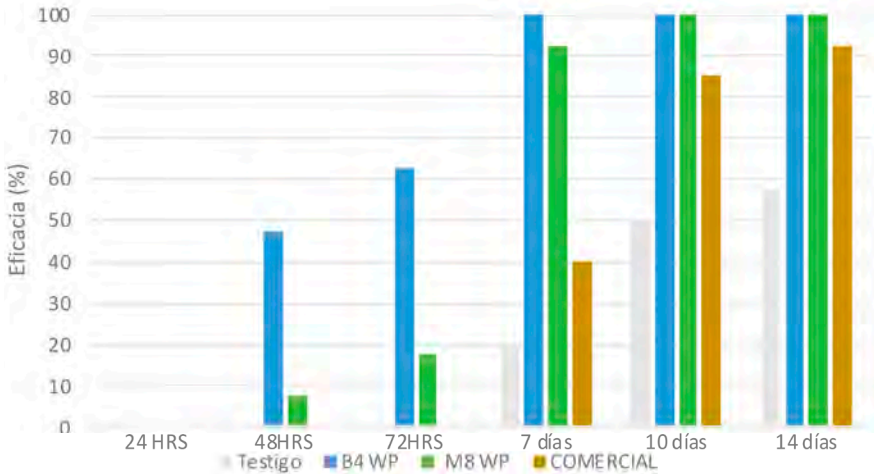


Figura 8. Eficacia de polvos mojables de *Beauveria* y *Metarhizium* determinada por Abbott. Los tratamientos son: *Beauveria* (B4 WP) y *Metarhizium* (M8 WP), Micosplag WP (comercial) y agua (testigo)

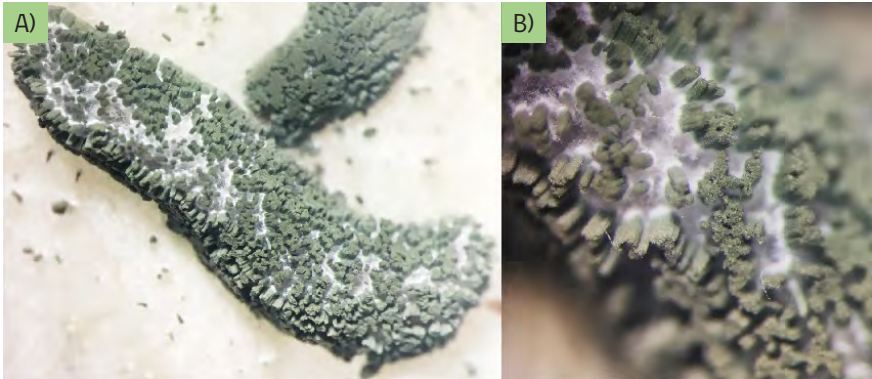


Figura 9. Ejemplo de infección sobre pupa con seda de *Metarhizium* formulado como polvo mojable A) formando esporodocios B).

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

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

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

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

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



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

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

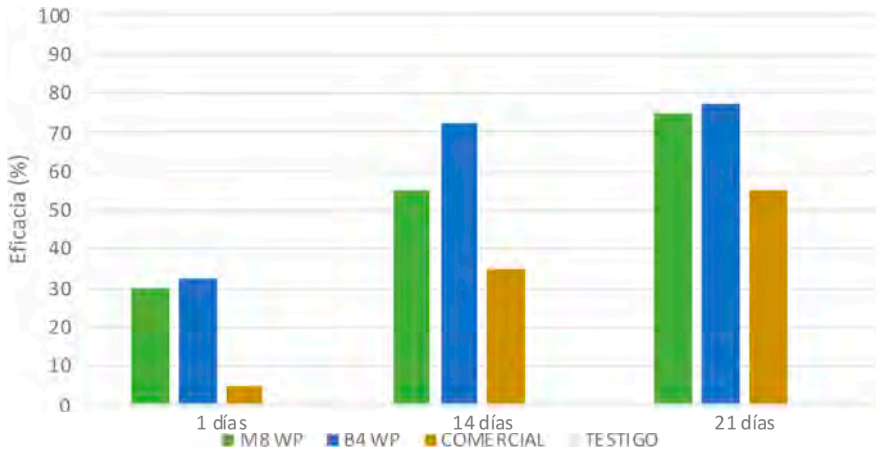


Figura 11. Porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Henderson & Tilton, a los distintos días de revisión. Donde M8 WP; *Metarhizium 8* polvo mojable y B4 WP; *Beauveria 4* polvo mojable (región Metropolitana, La Pintana, predio rural) junio-julio 2018.

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

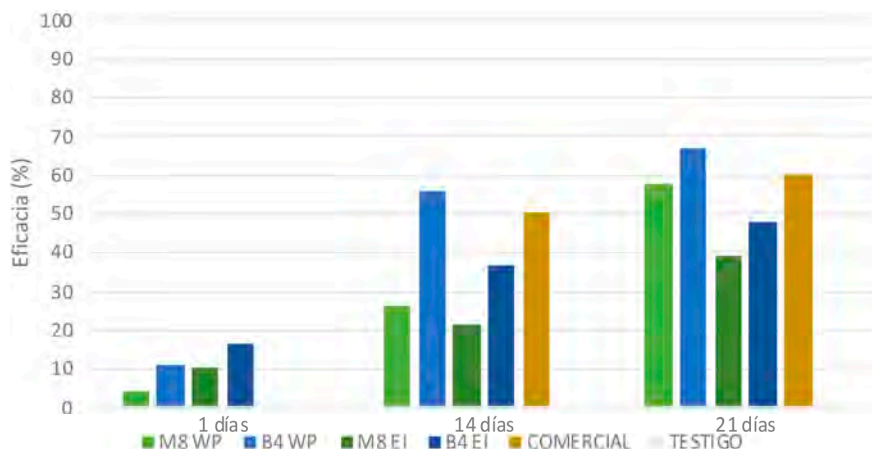


Figura 12. Gráfico de porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Henderson & Tilton, a los distintos días de revisión. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable, B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable, M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa.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

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

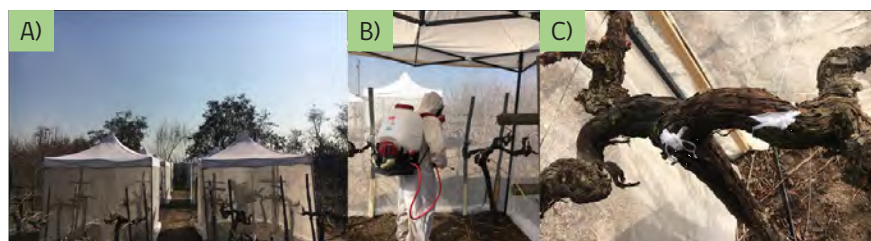


Figura 13. Ensayo de infestación controlada invernal de bioseguridad. A) Repeticiones en campo de toldos con malla antiáfidos completamente cerrados. B) Aplicación de plaguicidas microbianos formulados en base a HEP. C) Mallas de tul con pupas con seda insertadas en el ritidomo de las parras. región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

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

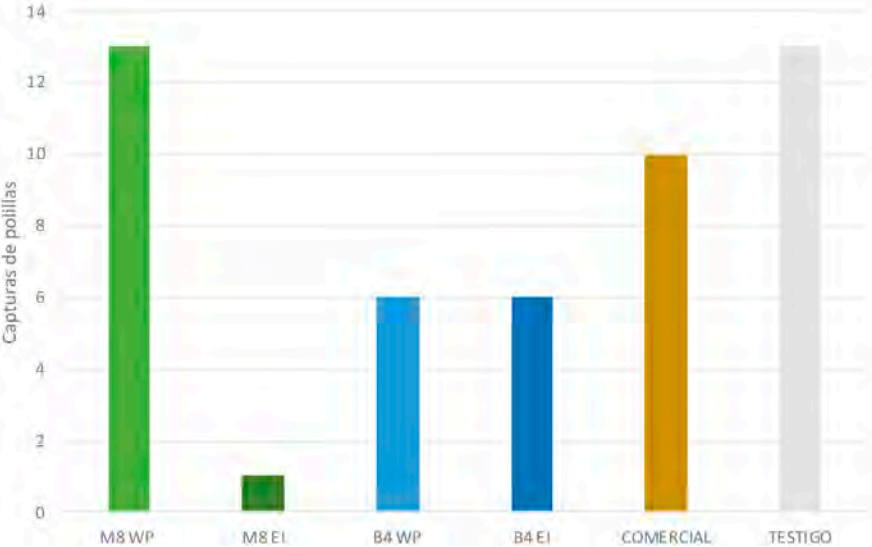


Figura 14. Captura de polillas de *Lobesia botrana* en trampas de feromonas, post aplicación de los tratamientos en INIA La Platina. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable, B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable, M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa (región Metropolitana,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

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

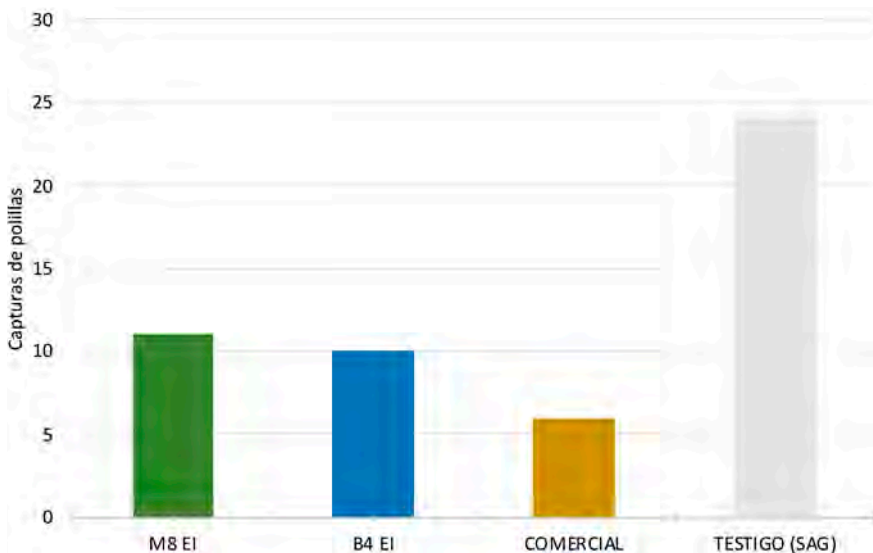


Figura 15. Captura de polillas de *Lobesia botrana* en trampas de feromonas, post aplicación de los tratamientos en Fundo San Luis de Manantiales. M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa (región Libertador B. O’Higgins, Placilla) Sept.- Oct 2018.

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

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

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



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

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

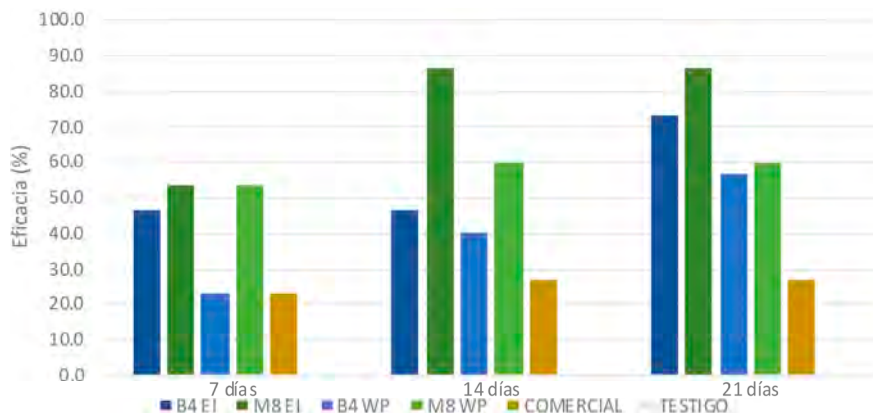


Figura 17. Porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Henderson & Tilton, a los distintos días de revisión. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable y B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable; M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa (región Metropolitana,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

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

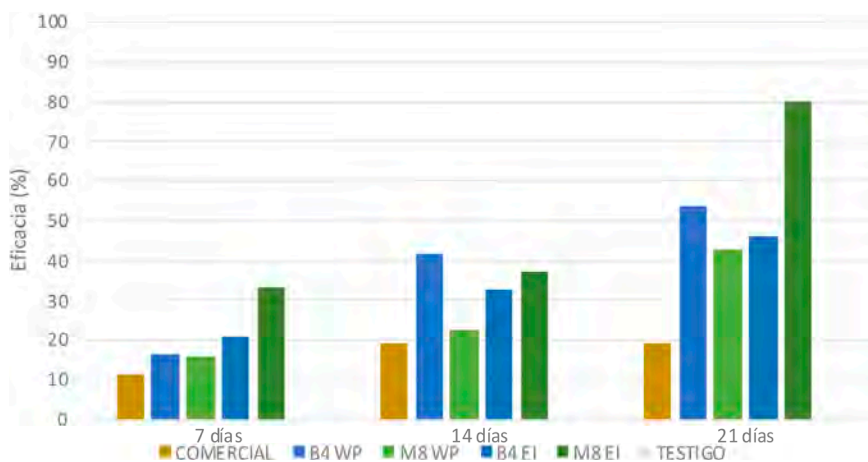


Figura 18. Porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Henderson & Tilton, a los distintos días de revisión. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable y B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable; M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa (región Libertador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

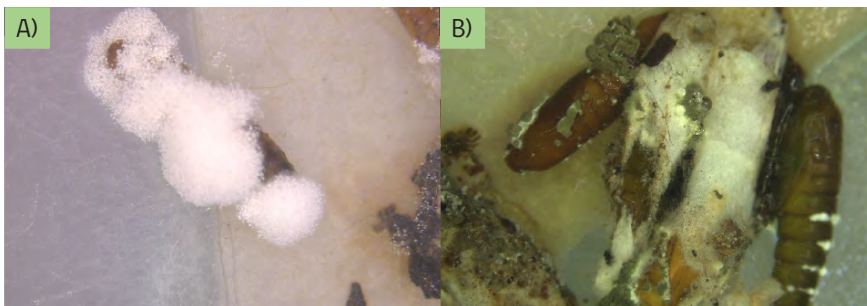


Figura 19. Ejemplo de pupas con seda extraídas de los ensayos de campo de la región de O'Higgins infectadas por plaguicidas microbianos. A) Beauveria. B) Metarhizium.

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

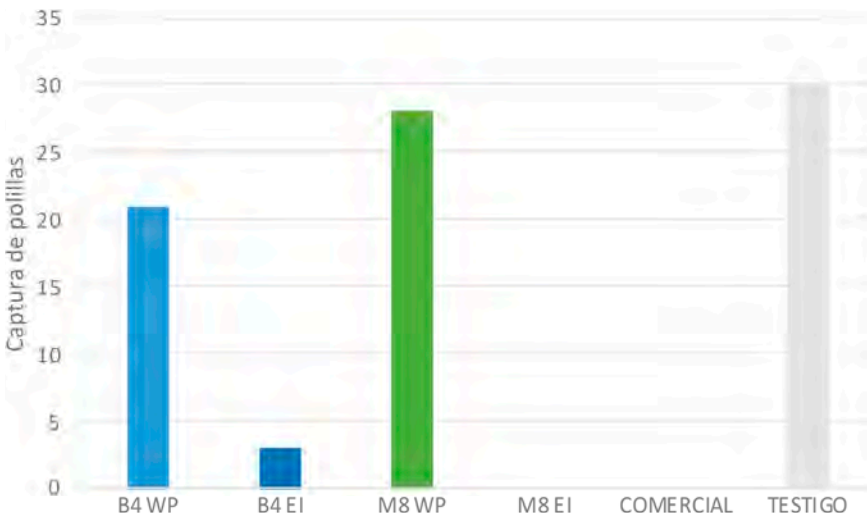


Figura 20. Captura de polillas de *Lobesia botrana* en trampas de feromonas, post aplicación de los tratamientos en INIA La Platina. Donde M8 WP; *Metarhizium* 8 polvo mojable, B4 WP; *Beauveria* 4 polvo mojable, M8 EI; *Metarhizium* 8 emulsión inversa, B4 EI; *Beauveria* 4 emulsión inversa (región Metropolitana,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

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

3.4. Resultados temporada invernal 2019. Región de Valparaíso

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

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

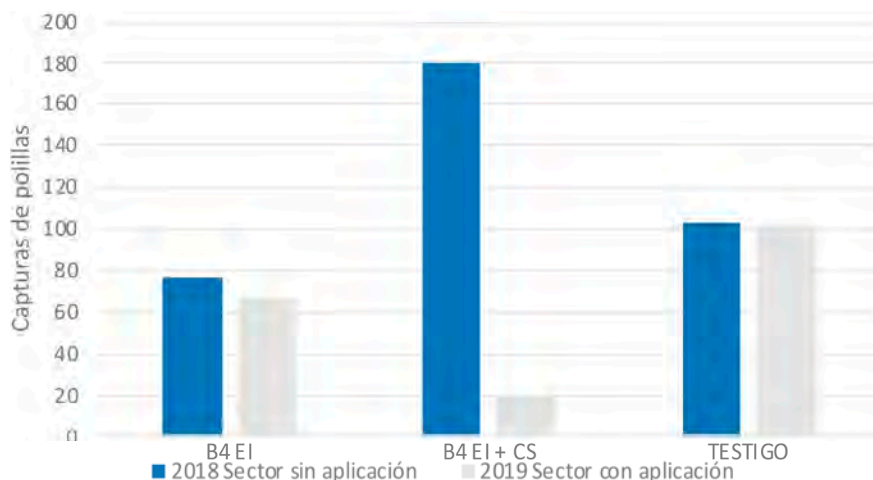


Figura 21. Porcentaje de capturas de machos de *L. botrana* en sector urbano de Olmué. En azul se presentan las capturas 2018. En plomo las capturas 2019. B4 EI, Beauveria 4 Emulsión inversa. CS, Confusión Sexual. TESTIGO, Sector sin aplicación.

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

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

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

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

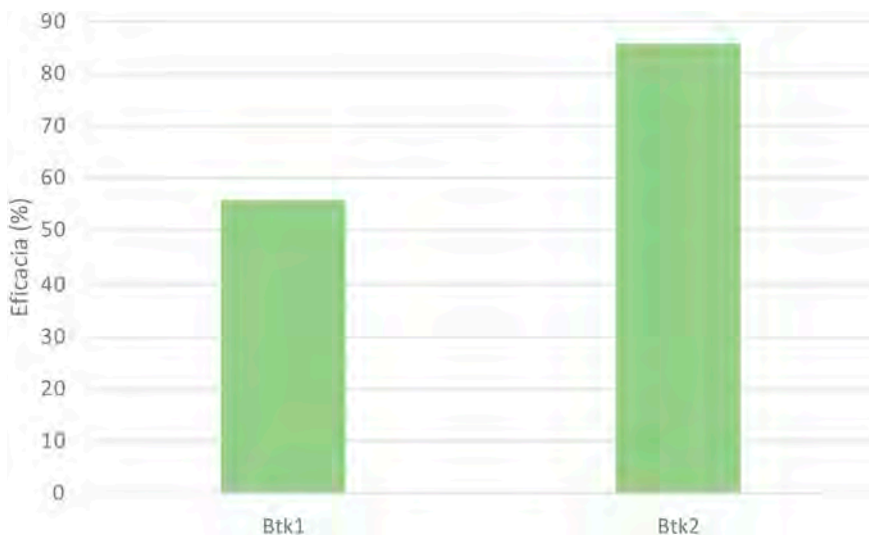


Figura 22. Eficacias de plaguicidas microbianos en base a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en vides.

4. Propuesta de manejo integrado de *Lobesia botrana*

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

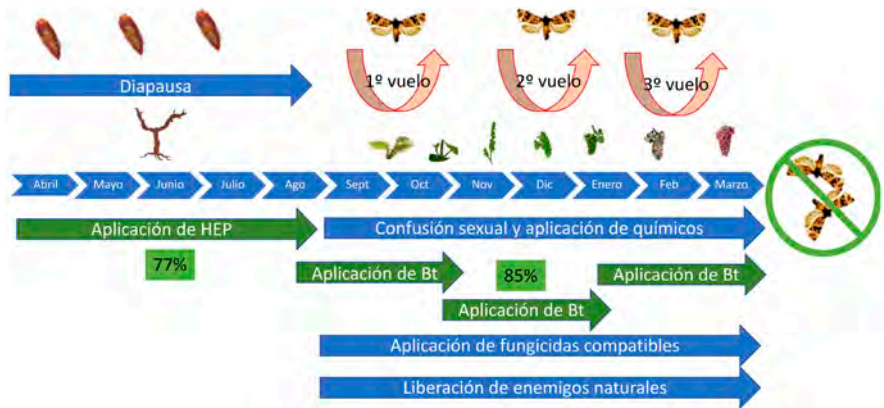


Figura 23. Propuesta de manejo integrado en base a hongos entomopatógenos y *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* para control de distintos estados de *Lobesia botrana*.

5. Conclusiones

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Bibliografía

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

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

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

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

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

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

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

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

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