

## PROTOCOLO

**Evaluación de la eficacia de control de productos comerciales en base a parasitoides del género *Trichogramma*, sobre huevos *Lobesia botrana* (Denis&Schifferrmüller) en ensayos de campo en vid (*Vitis vinifera*), con infestación controlada.**

**Mesa Público-Privada de Investigación del Programa Nacional de *Lobesia botrana* (PNLb)**

Septiembre de 2016

### **Introducción**

El género *Trichogramma* abarca un grupo de alrededor de 220 especies de microavispa parasitoides de huevos de insectos, principalmente de lepidópteros, las cuales han sido utilizadas frecuentemente en el control biológico inundativo de algunas especies de polillas que constituyen plagas agrícolas. Las hembras de estos insectos parasitan los huevos de su hospedante, donde su larva se alimenta del embrión y otros contenidos del huevo parasitado, destruyéndolo.

Existen algunos antecedentes en la literatura científica que distintas especies de *Trichogramma* han sido observadas asociadas a huevos de la “polilla del racimo de la vid” *Lobesia botrana*, constituyendo en consecuencia un punto de interés conocer su eficacia como controladores biológico en las condiciones nacionales.

Por lo señalado, la mesa de investigación del PNLb, liderada por el INIA y la FDF, en la cual participan además investigadores y profesionales de diversas instituciones como Universidad de Chile, Universidad Católica, ASOEX, y SAG, consideró necesario establecer un lineamiento único para la evaluación de eficacia en campo, bajo condiciones nacionales, de *Trichogramma* spp., sobre huevos de *Lobesia botrana*, lo cual se presenta en este documento.

### **Alcance Territorial**

El o los ensayos se realizarán en Estaciones Experimentales o huertos comerciales previamente autorizados por el SAG, ubicados en las Regiones Metropolitana, O’Higgins y Maule, que se encuentren bajo el esquema de contención de la plaga y dentro de los radios de control obligatorio de la plaga (500 metros). Los ensayos deberán regirse por el presente protocolo y sus anexos.

## 1. Antecedentes generales

Se deberá proporcionar al SAG:

- Identificación de la empresa o institución que solicita la autorización de SAG para ensayar las especies/linajes que desea comercializar. Nombre, razón social, RUT, nombre y RUT del representante legal, teléfonos, correo electrónico, dirección.
- Identificación de la Institución o empresa responsable de la realización del ensayo, en caso de que fuera distinta a la empresa o institución solicitante. Nombre, razón social, RUT, nombre y RUT del representante legal, teléfonos, correo electrónico, dirección.
- Nombre del profesional que actuará como la Contraparte de la Institución o empresa ante el SAG
- Nombre y dirección de la(s) empresa(s) u organización(es) que actúen como proveedores de *Trichogramma* para la ejecución del ensayo de campo.
  - Respecto la especie (producto comercial) y presentación de la/s especie/s de *Trichogramma* a evaluar, se deberá considerar lo siguiente: Nombre comercial, si fuera el caso.
  - Identificación de la/s especies/raza a ser ensayadas.
  - Informe de identificación de la/s especie/raza a ser ensayada, emitido por un especialista del grupo, indicando el método utilizado (molecular, morfológico) y la documentación de respaldo (fotografías, dibujos, secuencias, etc.).
  - Copia de la autorización de importación del informe final de cuarentena aprobado por SAG, cuando las microavispa sean de origen extranjero.
  - Descripción del dispositivo de liberación y sustrato biológico de liberación (especie de polilla que actúa como hospedero alternativo) de los *Trichogramma*, indicándose además una estimación N° de individuos viables que se liberan en el formato.
  - Lugar de producción y envasado del formato de liberación de los *Trichogramma*.
  - Número de generaciones por las cuales los *Trichogramma* han sido criadas en el hospedero alternativo. Indicar si el material a evaluar ha sido multiplicado en huevos de *L. botrana* en forma previa al ensayo.
  - Requerimientos de transporte y viabilidad de los *Trichogramma* hasta su liberación a campo.
- Copia de publicaciones o ensayos nacionales o extranjeros que indiquen porcentajes de control de huevos de *Lobesia botrana* por parasitoides del género *Trichogramma*.
- Países donde se utilice el producto para el control de *Lobesia botrana* (no es una condición, se deberá completar en el caso de que así fuera)
- Identificación, ubicación y georreferencia de la Estación Experimental o huerto comercial (incluir mapa).
- Fecha estimada de inicio y término de los ensayos.

## 2. Definiciones

- **Ensayo de campo:** procedimiento para comparar diferentes variables experimentales (formatos de presentación, dosis, especies, razas de *Trichogramma* spp., etc.), bajo un diseño experimental idóneo y cuyos resultados son sometidos a un análisis estadístico adecuado. El diseño experimental permite aislar todos los factores que pueden influir en los resultados exceptuando aquellos que se desea comparar.
  - **Tratamiento del ensayo:** el resultante de cada nivel de los factores en estudio (por ejemplo diferentes dosis de una misma especie) o de la combinación de dos o más factores de estudio (por ejemplo dosis x especie). Cada parcela que recibe un tratamiento constituye una repetición o réplica. Evaluación de especies del género *Trichogramma* con el objeto de determinar su eficacia sobre *Lobesia botrana*, bajo condiciones edafoclimáticas nacionales.
3. **Tratamiento control absoluto (testigo absoluto):** se refiere al conjunto de repeticiones o réplicas que se manipulan exactamente igual que el resto del ensayo, salvo que no reciben las aplicaciones o liberaciones de *Trichogramma*, a objeto de estimar el nivel de daño y/o infestación de la plaga en ausencia de medidas de control.

## Condiciones experimentales

### 3.1 Cultivo: *Vitis vinifera* u otras especies bajo control oficial

Los ensayos podrán ser realizados en cualquier variedad de vid de mesa o vinificación, de acuerdo a la disponibilidad en cada Estación Experimental o huerto comercial u otra especie que se considere necesario, previa autorización del SAG.

### 3.2 Organismo plaga: *Lobesia botrana*

El estado a controlar será huevos. Para ello se deberá utilizar huevos blancos frescos de un máximo de edad de 24 horas. Será responsabilidad de cada Estación Experimental autorizada, contar con material de calidad para cumplir con el número mínimo exigido en este Protocolo para realizar los ensayos de eficiencia parasítica.

### 3.3 Origen del material biológico:

*Lobesia botrana* se pueden obtener de crías artificiales de Laboratorios autorizados por el SAG.

Parasitoides: Producidos en Chile o en el extranjero (en este caso anexar los estudios de dosis comercial por hectárea y con respaldo científico que demuestre efectividad sobre *Lobesia botrana*). La dosis ensayadas serán las dosis (producto/ha) a implementar posteriormente si el estudio fuese aprobado por la Mesa de Manejo y el SAG.

**En el caso de ser parasitoides producidos en el extranjero, se deberá cumplir previamente con las exigencias de ingreso y de cuarentena del SAG de acuerdo a la Resolución N° 2.229/2001.**

### **Antecedentes del huerto de vides**

- Variedad
- Sistema de conducción
- Superficie del ensayo y cuartel
- Marco de plantación
- Plan de manejo de *Lobesia botrana* (confusión sexual, químicos)
- Plan de manejo para otras plagas
- **El sector del ensayo no deberá tener aplicaciones de azufre ni de ningún plaguicida que no sea considerado como tratamiento mientras dure el ensayo**

Además, se deberá especificar las características del lugar de ensayo:

- Tipo de suelo
- Fertilización
- Porta injerto
- Edad de las plantas
- Altitud

### **3.5 Diseño experimental**

La estación experimental deberá seleccionar el diseño dependiendo de la condición del huerto seleccionado. El diseño experimental podrá corresponder a:

- a) Diseño completamente al azar (DCA), con al menos cuatro (4) repeticiones. Se deben asignar los tratamientos al azar, a través de una tabla de números aleatorios u otro método azaroso. En DCA, con análisis de la covarianza, considerar que los grados de libertad del residuo deben ser mayor o igual a 12.
- b) Bloques completos al azar (BCA), con al menos cuatro (4) repeticiones, correspondiendo el bloque a una o más hileras, dependiendo del lugar del ensayo. Se deberá utilizar BCA en el caso que exista un elemento perturbador, en donde la estación experimental deberá definir cuál será el factor de bloqueo que influirá en la variable respuesta.

Cada repetición (unidad experimental) deberá estar conformada por al menos seis (6) plantas de vid, donde se infestarán 6 racimos por tratamiento en cada repetición. Tanto las plantas como los racimos infestados, deberán quedar debidamente identificados en cada unidad experimental. Alrededor de cada

parcela se deberá dejar una zona “buffer”, de un ancho que asegure que no habrá contaminación cruzada entre los diferentes tratamientos con *Trichogramma*. Además, se debe generar un croquis detallado de la ubicación de las plantas.

En caso de ejecutar el ensayo en una especie distinta a la vid, el diseño experimental y el protocolo de evaluación se analizarán caso a caso.

### **3.6 Metodología**

#### **3.6.1 Ensayos de eficacia**

##### **3.6.1.1 Control en huevos**

La infestación con hembras de *L. botrana* se debe realizar horas antes de la liberación de los *Trichogramma*. En cada racimo seleccionado, protegido con tul “manto térmico”. Se colocarán el número de hembras fertilizadas que garanticen un mínimo de 40 huevos por racimo, las cuales se mantendrán en un plazo de 24 horas, previas a la liberación del parasitoide.

Con el fin de asegurar una cantidad mínima de huevos, se considera aumentar la cantidad de racimos a infestar, pasando de 6 a 8 racimos por repetición, manteniendo la evaluación final de 6 racimos en laboratorio, la cual se realizará 3 días después de la liberación de los parasitoides.

Ver Anexo 2: Procedimiento de infestación artificial.

## **4. Tratamientos**

Se deberá describir el tipo de dispensador a utilizar y número de huevos parasitados en cada uno, señalando el total por repetición y su equivalente en número de individuos viables de *Trichogramma* a liberar por hectárea. Para estimar la viabilidad del material liberado se deberá aplicar la metodología de control de calidad recomendada por la Organización Internacional de Control Biológico (IOBC), en lo atinente a *Trichogramma*.

### **4.1 Tipo de tratamientos**

Los tratamientos podrán ser distintas cantidades de individuos viables de trichogrammas liberados de una misma especie o una combinación de especies (indicándose porcentaje de cada una). El ensayo podrá contemplar además tratamientos con insecticidas de origen biológico u otros combinados. Para la realización de un tratamiento mixto (ejemplo parasitoides + Bacillus), se requerirá de una discusión técnica con el investigador ejecutante y el equipo PNlb.

### **Evaluación de parasitismo natural por *Trichogramma* spp.**

Con el propósito de conocer la existencia y magnitud de parasitismo natural de *Trichogramma* spp. en el lugar del ensayo sobre las poblaciones locales de *L.*

*botrana*, una semana antes del inicio de la liberación de las *Trichogramma*, se infestará con un total de 40 huevos centinelas por racimo y unidad experimental. Para la evaluación se utilizará la misma metodología consignada en el punto 3.6.1.1.

### **Medición de viabilidad de *Trichogramma* en las presentaciones del producto a ser sometidas a liberación**

Dado que se estará evaluando la eficiencia de un organismo vivo, se deberá tomar una muestra representativa de la presentación de *Trichogramma* que será evaluada, la cual bajo condiciones de laboratorio será sometida a evaluación destinada a medir el nivel de individuos viables de la misma y que deberá reflejar una estimación del N° de individuos de la microavispa que se liberarán en los ensayos

Si el ensayo contempla liberaciones de *Trichogramma* de distintas partidas y/o en distintos momentos, se deberá conocer y evaluar este parámetro en cada caso; siguiendo las instrucciones de la IOBC

Para lo anterior se deberá utilizar un **indicador de emergencia** de *Trichogrammas*, utilizando para ello un tubo o frasco de unos 10 a 15 cm de largo, y 3 a 5 cm de diámetro cubierta la parte inferior con papel negro hasta la mitad, y parte superior expuesta a la luz y tapada con algodón. En la base, parte oscura se coloca la muestra conocida de trichogrammas y en la parte superior unos 40 huevos de *Lobesia botrana* de 24 hrs de edad (véase Figura1).

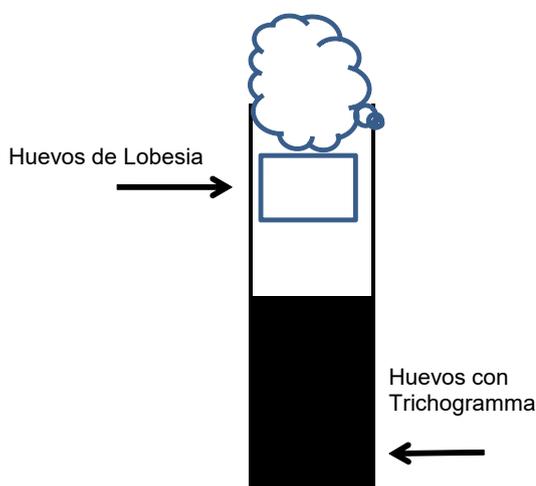


Figura 1. Tubo o frasco (10 a 15 cm de largo, y 3 a 5 cm de diámetro cubierta la parte inferior con papel negro hasta la mitad, y parte superior expuesta a la luz y tapada con algodón. En la base, parte oscura se coloca la muestra de trichogrammas y en la parte superior unos 40 huevos de *Lobesia botrana* de 24 hrs. de edad

## **Variables a medir:**

### **a) Porcentaje de parasitismo: Evaluación de eficacia de *Trichogramma* spp.**

La eficacia de cada especie y presentación de *Trichogramma* spp. se deberá realizar en base a la medición del % de parasitismo a campo sobre huevos de *L. botrana*. Como indicador, los huevos parasitados, toman un color negro en aproximadamente 7 días en laboratorio.

Para esto, después de tres (3) días de realizada la liberación de los *Trichogramma* spp. a ser evaluados, se deberá tomar la totalidad de la muestra de 24 racimos, cada uno de los cuales deberá ser mantenido de manera individual a 15-20°C, bajo condiciones controladas de laboratorio y fotoperiodo de 12/12, con el propósito de promover la eclosión de larvas de *L. botrana* o la emergencia de adultos de *Trichogramma* spp., los cuales deberán ser contabilizados, a objeto de estimar el % de parasitismo según la fórmula siguiente:

**Porcentaje de Parasitismo** = Número total de huevos parasitados/ Total de huevos encontrados x 100.

Si se determina que existe infestación natural por *Trichogramma* spp., antes del ensayo, el promedio observado en el testigo deberá descontarse del parasitismo observado en cada tratamiento.

### **b) Eficacia de *Trichogramma* spp.**

Esto se medirá en base a mortalidad de huevos.

**Mortalidad de huevos de *L. botrana*** = Huevos parasitados+huevos destruidos por host feeding.

## **4.2 Modo de liberación o aplicación del producto**

Una vez que los racimos presenten huevos de *L. botrana* (luego de las 24 horas en contacto con hembras fecundadas), se procederá a verificar la infestación, contabilizando el número de huevos por racimo. Si la cantidad de huevos es la adecuada para la realización de los experimentos (mínimo de 40 huevos por parcela), se procederá a retirar las hembras y las mallas tul, dejando los huevos expuestos. En ese mismo momento se realizará la liberación de los parasitoides. De esta forma se asegura que los huevos presentan la misma edad y por tanto no existirá ningún tipo de preferencia.

## 5. Modo de evaluación, registro y mediciones

### 5.1 Determinación de la eficacia del control

La evaluación de eficacia considerará la medición de los parámetros y frecuencia, según se detallan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Parámetros y Frecuencia de medición, para la evaluación de eficacia del control.

Evaluación (nº)	Frecuencia DDA*	Registro/ racimo	Número de racimos	Observaciones
1	Pre aplicación  (inspección en campo)	Número de huevos vivos	24** racimos/tratamiento	Infestar con hembras apareadas de 2 a 3 días de edad
2	5  (inspección en laboratorio)	Número de huevos parasitados/racimo  Número de larvas vivas/racimo  Número de racimos infestados	24** racimos/tratamiento	Los análisis de eficacia, deberán ser realizados por personal de instituciones autorizados por SAG.

\*días después de la aplicación

\*\* 6 racimos/repetición

Los resultados deberán ser sometidos a un análisis de varianza y a una prueba rango múltiple con una probabilidad del error  $\leq 0,05$

La mortalidad de huevos si la cantidad de huevos no es homogénea, deberá ser calculada mediante la fórmula de Sun-Shepard's para poblaciones desuniformes.

#### Formula de Sun-Shepard's

$$\text{Grado de Eficacia de Sun-Shepard} \square\square = \frac{Pt \pm Pck}{100 \pm Pck} * 100$$

Donde:

Pt = Porcentaje de mortalidad, calculado de la diferencia en el numero de individuos objetivo vivos antes de la aplicación, menos el numero de individuos objetivo vivos después de la aplicación.

Pck = % de cambio en la población (aumento (+) o disminución (-)), calculado de la diferencia en el numero de individuos objetivo vivos antes de la aplicación, menos el numero de individuos objetivo vivos después de la aplicación en la parcela testigo.

## **5.2 Identificación de especies**

Se deberá tomar una muestra de huevos parasitados por repetición para determinar la posterior emergencia de adultos. Los adultos emergidos deberán ser guardados en tubos debidamente etiquetados, en alcohol al 95% y ser mantenidos en frío. Posteriormente éstos serán utilizados para identificación de las especies mediante técnica de PCR, realizado por laboratorios autorizados por el SAG que posean los marcadores moleculares correspondientes.

## **5.3 Información meteorológica**

Se deberán registrar los datos meteorológicos que puedan afectar la calidad y la persistencia del tratamiento. Esto incluye normalmente al menos precipitaciones (cantidad en mm), temperatura (media, máxima, mínima en °C). El viento sólo se medirá el día de la aplicación. La información meteorológica será registrada previa a la fecha de aplicación (a lo menos tres días antes y durante todo el tiempo que dure el ensayo).

## ANEXOS

### Anexo 1. Medidas de bioseguridad a implementar en los ensayos para probar la eficacia de productos comerciales de tipo biológico.

(Elaboradas por el Servicio Agrícola y Ganadero)

#### 1. Sobre el lugar del Ensayo:

- El predio debe ubicarse en áreas de control de la plaga y no podrá corresponder a regiones bajo el esquema de erradicación, áreas consideradas de baja prevalencia o lugares que el SAG estime como no adecuados para la realización de los estudios.
- La autorización del predio y sectores para la realización del ensayo tendrá una duración máxima de una temporada (desde septiembre del primer año a agosto del año siguiente), renovables a solicitud del interesado previo cumplimiento de los requisitos solicitados por el SAG.
- El predio donde se implementen los ensayos deberá contar con bajos niveles poblacionales de la plaga. (Con el fin de evitar interferencia generada por posibles infestaciones de la plaga)

#### 2. Requerimientos de bioseguridad

- Se deberá entregar un mapa con la ubicación del predio y sectores del ensayo (coordenadas geográficas y polígonos, identificando tratamientos, repeticiones y testigo).
- El material que utilizará para enmallar los racimos deberá ser una malla tipo "manto térmico" que se compra por rollo, con la cual se debe generar una bolsa de 34cm de largo por 20cm de ancho (Figura 2)



Figura 2. Rollo de malla manto térmico.

Las especificaciones de la malla “manto térmico” se presentan a continuación:

Nombre : Manto Térmico o Antiheladas  
(100% material virgen de Polipropileno)

Medidas de anchos : 1.05 – 1.38 – 4.10 mts

Medidas de largo : 1.000 mts

Color : Blanco

Gr/m<sup>2</sup> : 17 gr/m<sup>2</sup>

Permeabilidad a luz: 98%

Sombra : 2% (SOMBRA CON LUZ DIFUSA)

- El material del espiral puede ser alambre grueso corresponde al N° 10 y se utiliza aproximadamente 2 metros para una bolsa de esas dimensiones, según lo ha implementado INIA en ensayos anteriores.
- Debido a que los predios donde se realizará el ensayo están insertos en áreas bajo control obligatorio de la plaga, sólo podrán eximirse de la realización de los tratamientos establecidos en las regulaciones oficiales, en los sectores donde se realice el estudio, previa autorización mediante resolución emitida por el SAG. Lo anterior, no exime al predio de cumplir con las medidas del control oficial SAG referidas a los movimientos de fruta y circulación de artículos reglamentados.
- Al finalizar el estudio, se deberá realizar un tratamiento con aplicaciones químicas con los productos autorizados por el Control Oficial, en todo el sector donde se realizó el estudio, incluido el testigo, en la medida que el ciclo de la plaga lo permita, u otro tratamiento de control propuesto por el interesado y aprobado por el Servicio.
- El SAG tendrá la facultad de suspender en cualquier momento el estudio y exigir que el predio se incorpore a un plan de manejo, si se determina un posible riesgo para los predios vecinos o el no cumplimiento de alguna de las medidas dispuestas en el presente protocolo.
- Todas las medidas antes mencionadas serán verificadas por inspectores del Servicio. En el caso que el inspector considere que existe riesgo de dispersión de la plaga desde el lugar del ensayo, podrán ser exigidas medidas adicionales de mitigación del riesgo.
- Se deberá describir a priori el procedimiento de eliminación del material biológico y desechos sobrante, para el caso en que se produzcan.
- Sobre el material biológico proporcionado para la realización de los ensayos se deberá indicar e informar al SAG cuando el material sea llevado a otras

empresas con fines asociados a los ensayos en cuestión, previamente autorizados por el SAG.

### 3. Sobre los registros:

- El interesado deberá dar aviso al Programa Nacional de *Lobesia botrana* (PNLb) de las fechas en que realizará las aplicaciones donde se realice el ensayo con al menos 2 días hábiles de anticipación. Comunicar al correo [mariapaz.azocar@sag.gob.cl](mailto:mariapaz.azocar@sag.gob.cl).
- La institución ejecutante de los ensayos deberá contar con un registro de las fechas en que se realizaron los tratamientos, las dosis aplicadas, mojamientos, estadio de los huevos al momento de realizar la aplicación y otros. Estos registros deben estar disponibles en todo momento para los fiscalizadores del SAG.

### 4. Sobre la calidad del material parental:

Para la verificación de hembras grávidas o fecundadas, una muestra de 10 polillas hembras deberán ser enviadas al laboratorio del SAG de lo Aguirre o a otro que el SAG determine, por cada proceso o partida de polillas utilizadas en el proceso de infestación.

### 5. Sobre el traslado del material parental:

Para el traslado desde laboratorio a huerto, los tubos con las polillas se deben colocar en un cooler con hielo y /o Ice pad, lo suficiente para mantener la temperatura menor o igual 10°C durante el traslado. Luego el cooler debe ser sellado con cinta adhesiva para su traslado al huerto.

Cada traslado de material biológico vivo hacia el huerto, deberá ser avisado al SAG ([mariapaz.azocar@sag.gob.cl](mailto:mariapaz.azocar@sag.gob.cl), [maria.oyarzun@sag.gob.cl](mailto:maria.oyarzun@sag.gob.cl)) con 2 días hábiles de anticipación.

## **Anexo 2. Procedimiento de infestación**

Las hembras fertilizadas (previo cruzamiento en laboratorio por un periodo de 2 a 3 días a temperatura ambiente (25°C) provenientes de crianza artificial), se deben colocar en tubos con tapa rosca de 50 ml en grupos de 8 polillas, manejado entre 5 a 7 °C en cámara refrigerada. La infestación de cada racimo, se procede mediante la manipulación entre dos personas, una sostiene la abertura superior del tul y la otra persona saca el tubo vaciando uno por uno mediante un golpe físico de la base del tubo al interior del tul. Dado el frío mantenido del material, la polilla caerá sin dificultad.

Se deberá confirmar el estado de la plaga mediante observación previa al tratamiento.

A las 24 horas, mediante el uso de aspirador manual u otro medio deberán ser retirados los adultos, evitando que las polillas escapen, luego verificar la infestación y contabilizar el número de huevos por racimo. De esta manera se conocerá la población inicial de cada tratamiento.

Para mantener el material (adultos o huevos) en el racimo se instalará, cubiertas de tul como se muestra en las siguientes fotos. Se deberá incluir un espiral de alambre para evitar que los racimos queden en contacto con el tul.



Figuras 3 y 4. Detalle de trampa jaula. Trampa instalada en racimo de uva. Pupa y adulto de *L. botrana* en trampa.

## Literatura citada

Fermaud, M., I. P. Pracros, R. Roehrich and J. Stockel 1996. Evaluation of an Artificial Infestation Technique of Grape with *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) Journal of economic entomology

Püntener, W. 1981 Manual for field trials in plant protection Second edition. Agricultural Division, Ciba-Geigy Limited. 19 p.