



NOMBRE DEL PROYECTO.

Estudio para el control de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* mediante la técnica del insecto estéril (TIE) y agentes de control biológico en la VI región.

ZONA GEOGRÁFICA DE EJECUCIÓN.

Regiones VI, VII y VIII

INSTITUCIONES RESPONSABLES DE LA EJECUCIÓN.

AGENTE POSTULANTE. RESPONSABLE DEL PROYECTO:

Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)

INSTITUCIÓN ASOCIADA PARA LA EJECUCIÓN:

Universidad de Talca

RESUMEN DE COSTOS Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO (\$).

COSTO TOTAL DEL PROYECTO:	100%	\$487.130.398.-
TOTAL APOORTE SAG:	48%	\$233.031.261.-
TOTAL APOORTE AGENTE:	52%	\$254.099.137.-



FECHA DE INICIO Y DURACIÓN DEL PROYECTO (EN MESES).

FECHA DE INICIO	1 de marzo de 2008
FECHA DE TÉRMINO	1 de marzo de 2012
DURACIÓN DEL PROYECTO (MESES)	48 meses

PROPÓSITO. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

El propósito a largo plazo del proyecto es contribuir a preservar los mercados de las exportaciones chilenas de pomáceas y carozos, reduciendo las detecciones de la polilla de la manzana (*Cydia pomonella*) tanto en origen como en destino. Este propósito se podrá alcanzar en la medida que se genere la información necesaria para decidir si la técnica del insecto estéril (TIE) es implementable en Chile. En consecuencia, los objetivos específicos a alcanzar son los siguientes:

Generar un debate a nivel de productores, exportadoras y autoridad sanitaria (SAG) en torno al uso de la TIE en Chile para el control de *Cydia pomonella*.

Elaborar un protocolo de producción industrial de *C. pomonella*, adaptado a las condiciones e insumos del país.

Determinar la existencia de estructura genética de la(s) población(es) de *C. pomonella* en Chile mediante herramientas de biología molecular.

Realizar los estudios básicos necesarios para evaluar la TIE: competitividad de los machos estériles vs machos normales; sensibilidad a la feromona sexual de *C. pomonella*; dosis de radiación; cortejo; capacidad de vuelo y actividad según temperatura y evaluar en campo la eficacia de la TIE, a una escala piloto.

Cuantificar la resistencia a los principales insecticidas usados contra *C. pomonella* en las distintas poblaciones determinadas en el punto 3 e identificar los genes responsables de la resistencia en las poblaciones determinadas como resistentes.

Determinar el ciclo biológico de *C. pomonella* en campo y contrastar los resultados con las predicciones de los modelos basados en acumulación de temperatura.

Evaluar hongos y nemátodos entomopatógenos en el control de *C. pomonella*.

RESULTADOS ESPERADOS AL FINALIZAR EL PROYECTO.

Una vez desarrollado el proyecto se dispondrá de la información técnica relevante para que la autoridad sanitaria adopte las medidas que reduzcan la incidencia de *Cydia pomonella* en las pomáceas de exportación, evitando los consiguientes rechazos y cierres de mercado.

Entre los resultados se incluye:

Lograr que los distintos actores involucrados interioricen las ventajas y desventajas de la TIE en Chile y que una vez terminado el proyecto exista un ambiente favorable para la legislación que la TIE requerirá en caso de ser adoptada.

Capacidad instalada en el país para producir al menos 100.000 polillas por semana, con el correspondiente protocolo (manual) para escalar esta producción.

Genotipos identificados de *C. pomonella* presentes en el país, en número y ubicación geográfica.

Al menos un genotipo de *C. pomonella* adecuado para TIE.

Al menos un aislamiento de hongo y al menos un aislamiento de nemátodos entomopatógenos eficaces contra larvas de *C. pomonella*.

Escala (ranking) de los principales insecticidas usados contra *C. pomonella*, ordenados de acuerdo al nivel de resistencia presente en las poblaciones chilenas de esta polilla.

Determinar al menos un factor que explique la diferencia entre las predicciones de los modelos y el desarrollo de *C. pomonella* en el campo.

IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS CRÍTICOS DEL PROYECTO.

Disponibilidad de infraestructura para la producción de 100.000 polillas por semana, durante al menos 4 meses por año.

Optimización de las técnicas de crianza industrial de *Cydia pomonella*.

Adecuada higiene en la crianza de *C. pomonella* para evitar la contaminación por patógenos (bacterias, virus y hongos).

Disponibilidad de insumos críticos en cantidad y oportunidad adecuados.

Adecuada provisión de recursos físicos y humanos para realizar la cobertura territorial.

Establecer un sistema de turnos o similares que permitan solucionar emergencias de

climatización, eléctricas u otros en un sistema de crianza que debe funcionar los 365 días del año, las 24 horas del día.

BENEFICIOS DEL PROYECTO.

Diferenciación de la manzana chilena con respecto a sus competidores.
Aumento de la eficacia de las actuales medidas de control de *C. pomonella*.
Reducción de costos por menor aplicación de insecticidas.
Reducción del riesgo de rechazo de embarques de manzana chilena y consiguientes cierres de mercado.
Reducción del gasto directo de re-apertura de mercado (comitivas SAG, nuevos requerimientos en huertos y packings de exportación).
Conservación e incremento de la imagen país.
Conservación de empleos.

BENEFICIARIOS(AS) DIRECTOS(AS) DEL PROYECTO.

Productores nacionales de manzano.
Trabajadores empleados en la industria de manzano.
Poblaciones rurales expuestas a las aplicaciones de productos destinados a *Cydia pomonella*.
Fisco de Chile.

DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LA METODOLOGÍA.

1.- DIFUSIÓN Y DEBATE EN TORNO A LA TIE EN CHILE.

La experiencia reunida en el extranjero en TIE, especialmente aquella relacionada con la polilla de la manzana, será dada a conocer a los actores del sector público y privado por medio de dos seminarios internacionales y de conferencias técnicas.

Los especialistas Marc Vreysen (Agencia Internacional para la Energía Atómica, Viena, Austria) y Alan Knight (Servicio de Investigación Agrícola, EE.UU.) han comprometido su apoyo al proyecto (ver anexo con cartas) y están dispuestos a viajar a Chile para participar en los seminarios. Por otro lado, INIA dispone de financiamiento para traer a la especialista Stephanie Bloem, quien estuvo a cargo del programa TIE para

controlar la polilla de la manzana en British Columbia.

En caso de lograr financiamiento adicional, se podría incorporar otros especialistas de Brasil y Argentina, recurriendo a la empresa privada o a programas de FIA.

En caso negativo, con los tres especialistas nombrados, más la participación de colegas chilenos y de SAG, se podrá organizar dos seminarios internacionales, uno en Talca y otro en Chillán o Rancagua, con el fin de difundir esta tecnología y analizar la factibilidad de implementarla, los requisitos que se debe cumplir y/o los obstáculos a remover.

2.- PRODUCCION INDUSTRIAL DE CYDIA POMONELLA.

2.1.- El núcleo inicial de la producción industrial de *Cydia pomonella* será la colonia que INIA Quilmapu ha mantenido durante los últimos 5 años. Esta colonia, con los altibajos propios del trabajo con seres vivos, ha logrado producir en promedio 500 adultos por semana y en ciertos meses se ha llegado a cosechar 10.000 ejemplares/ semana. La mayor parte de la crianza se realiza usando la dieta de Poitout y Blues (1974), basada en agar. Esta dieta es adecuada para estos niveles de producción, por motivos de costo deberá ser reemplazada.

2.2.- Para escalar al nivel deseado (100.000 individuos semanales), se requiere adecuar la infraestructura existente: 100 m² de salas de crianza construidas con paneles térmicos que INIA Quilmapu pondrá a disposición del proyecto. Estas salas tienen un adecuado aislamiento para prevenir el ingreso o salida de insectos, pero requieren ser mejoradas en cuanto a climatización, es decir, nuevos y más confiables equipos de aire acondicionado. Esto, a su vez, aumenta considerablemente el consumo eléctrico, por lo cual habrá que renovar el cableado eléctrico y muy probablemente instalar una estación trifásica. Asimismo, se requiere instalar un control en línea de las condiciones ambientales.

2.3.- Para reemplazar la dieta basada en agar, se utilizará una dieta basada en aserrín (Brinton y Proverbs, 1969; Proverbs et al. 1982) modificada a los insumos disponibles en el país o en Argentina. Sin embargo, dos elementos esenciales de la dieta, las vitaminas y las sales, necesariamente deberán ser importadas desde la empresa BioServ, EE.UU. El componente salvado de soya deberá ser importado de Argentina.

2.4.- La metodología de crianza será la usada en INIA desde 2003:

2.4.1.- Los adultos permanecerán en cilindros forrados interiormente con papel encerado o papel mantequilla. Los extremos de los cilindros estarán cerrados con tul. Cada 48 horas, los cilindros se llevan a una cámara de frío para inmovilizar a los adultos y retirar el papel con huevos, reemplazándolo por nuevo papel (Proverbs and Logan 1970). Los adultos permanecerán como máximo 7 días en los cilindros, a 28° C y fotoperíodo 16:8.

2.4.2.- El papel con los huevos será desinfectado con cloro al 1%, enjuagado con agua y secado a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocan a 25° C por dos días hasta que los huevos alcanzan el estado de cabeza negra, momento en que están listos para ser colocados en la dieta. Las planchas con huevos (papel) se colocan horizontales a 5 cm de las bandejas con dieta. Al enlosar los huevos, las larvas se deslizan por sí mismas a la dieta mediante un hilo de seda y comienzan a ingerirla.

2.4.3.- Las bandejas con larvas neonatas se trasladarán desde la sala de emergencia de huevos a las salas de desarrollo. Desde la eclosión hasta la pupa, las larvas tardan 21 días. Las larvas necesitan 30° C para completar su desarrollo en ese tiempo, con fotoperíodo largo (16:8). La primera semana las larvas estarán a un 70% de humedad, la segunda a un 50% y la tercera a un 35% de humedad relativa. En el día 21, las larvas se habrán transformado en pupas y serán trasladadas a la sala de emergencia de adultos.

2.4.4.- En la sala de emergencia de adultos éstos son atraídos por un panel de luz negra y serán colectados aspirándolos mediante una aspiradora de automóvil modificada. Este aparato fue creado en INIA Quilmapu y ha dado buenos resultados para “cosechar mecánicamente” los adultos de la polilla. Una vez cosechados los adultos, una parte será usada para continuar el ciclo y el resto estará disponible para ser irradiado.

2.4.5.- El control de calidad de la producción considerará lo siguiente (Proverbs and Logan 1982): pH de la dieta; % de viabilidad de los huevos; n° de huevos producidos por cilindro; % de mortalidad de larvas; % de

bandejas contaminadas; n° de pupas por bandeja de dieta; n° de adultos obtenidos por bandeja de dieta; peso de las pupas.

2.4.6.- Se realizará las siguientes pruebas: distintos compuestos y dosis para regular el pH de la dieta (ácidos cítrico, fumárico y tartárico); distintos compuestos como preservantes e inhibidores de hongos y bacterias (metil paraben, amoxicilina, nistoral); distintos productos como matriz (salvado de soya, afrecho, cascarilla de arroz, salvado de lupino).

3. ESTABLECER LAS CONDICIONES BÁSICAS PARA LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DEL INSECTO ESTÉRIL (TIE) EN *CYDIA POMONELLA*.

3.1.- Validación de la dosis de radiación necesaria para esterilizar *C. pomonella*. Se evaluará 3 dosis de radiación: 150, 250 y 300 Gy (Bloem et al. 2006b). Se comparará la capacidad de apareamiento y la competitividad de los individuos estériles con los normales de acuerdo al siguiente esquema de apareamientos:

N° polillas	condición	Dosis Gy		N° polillas	Condición
30	Macho estéril	150	x	30	Hembra fértil
30	Macho estéril	250	x	30	Hembra fértil
30	Macho estéril	300	x	30	Hembra fértil
30	Macho estéril	150	x	30	Hembra estéril
30	Macho estéril	250	x	30	Hembra estéril
30	Macho estéril	300	x	30	Hembra estéril
30	Macho fértil		x	30	Hembra fértil

Las evaluaciones serán: % de parejas en las que se observa apareamiento; duración en min del apareamiento (Gu et al. 2006; Bloem et al. 2006a).

3.2.- Capacidad de vuelo de machos estériles. Los machos estériles serán teñidos con pigmentos fosforescentes. Se liberará 100 machos en un punto y se colocará 4 trampas 10x en los cuatro puntos cardinales alrededor del punto de liberación. Las trampas se colocarán 25, 50 y 100 m de distancia del punto de liberación (Gerding y Devotto 2007). Las repeticiones serán variables de acuerdo a la disponibilidad de individuos y de sitios de liberación.

3.3.- Actividad den campo de machos estériles vs machos normales. Se liberará 500 machos de cada categoría (los estériles estarán teñidos) y se comparará los % de recaptura de cada categoría usando trampas 10x (Devotto y Gerding 2005).

3.4.- Definir dos localidades donde realizar las liberaciones de machos estériles. Una localidad debe tener condiciones de aislamiento geográfico, mientras que la otra no. En forma preliminar, las localidades que reunirían las condiciones son Manantiales (VI región), Penciahue (VII región), Yungay (VIII región y Angol (IX región). Las dos localidades seleccionadas servirían como pilotos.

3.5.- Esterilización de adultos. Los adultos producidos en INIA Quilmapu serán esterilizados en la Comisión Chilena de Energía Nuclear, La Reina, Santiago. Una vez irradiados, serán liberados en los huertos seleccionados en dosis de 1700 polillas / ha / semana, durante el vuelo de la primera y segunda generaciones de *C. pomonella*. El momento de liberación será determinado de acuerdo a la captura de adultos tanto en trampas convencionales (codlemona) como en trampas para capturar hembras (cebadas con éster de pera).

4. PRODUCCIÓN DE CONTROLADORES BIOLÓGICOS PARA COMPLEMENTAR LA TIE.

Las técnicas de producción de hongos y nemátodos entomopatógenos serán las mismas que ha usado INIA durante los últimos 15 años.

4.1.- Producción de hongos. INIA posee una colección de más de 1200 cepas de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Gerding et al. 1999). De acuerdo a la información de la base de datos, se seleccionará 20 aislamientos con antecedentes de haber sido colectados en huertos de pomáceas o bien atacar lepidópteros. Una vez definida la lista, los aislamientos seleccionados serán descongelados y multiplicados inicialmente en placas de agar con medio nutritivo (Devotto y Gerding, 2003). De acuerdo a nuestra experiencia, este sistema de producción es suficiente para realizar pruebas de laboratorio.

Para las pruebas en campo, los mejores aislamientos seleccionados en laboratorio serán multiplicados usando una técnica como fermentación en medio sólido (FMS), en este caso particular, en bolsas de arroz. Medio kilo de arroz se inocula con el aislamiento de interés, se mantiene 15-20 días en oscuridad hasta que el micelio cubre todos los granos y luego se produce la esporulación (Devotto et al. 2007). Posteriormente, el arroz se saca de las bolsas y se deshidrata. Luego, se cierne el arroz en el extractor de esporas (máquina que posee un movimiento horizontal continuo y filtros para separar el arroz de las esporas) y las esporas quedan en condición de ser usadas inmediatamente o envasadas al vacío y almacenadas.

4.2.- Producción de nemátodos. La producción de nemátodos se realiza in vivo, ya que los medios artificiales no son eficientes o resultan demasiado caros. En INIA se utiliza la polilla de la cera *Galleria mellonella* como hospedero alternativo en el cual multiplicar los nemátodos. La crianza de esta polilla se realiza a 30° C, en cajas metálicas de 15x20x40 cm, en las cuales las larvas se alimentan de cera. Los adultos se cosechan y se colocan en frascos de vidrio de 1 L, con papel doblado en forma de acordeón para que las hembras coloquen los huevos en ellos. Parte de las larvas se usa para continuar la colonia, mientras que otra parte se usa para la producción de nemátodos. Las larvas se colocan en bandejas plásticas en las cuales se encuentran los nemátodos en estado juvenil (el estado infectivo). Los nemátodos ingresan a la larva, se desprenden de la cutícula que los recubre y maduran sexualmente, produciéndose el apareamiento. Los nuevos individuos en estado juvenil se colectan mediante una trampa, se refrigeran y quedan disponibles para su uso.

4.3.- Pruebas de eficacia en laboratorio. El hongo *Metarhizium anisopliae* será evaluado contra larvas neonatas, larvas de 4-5 estadio y adultos, mientras que los nemátodos serán probados contra larvas entre 3-5 estadio. Esta decisión se basa en el potencial uso posterior de los organismos, ya que las aplicaciones de nemátodos contra *C. pomonella* se realizan en el suelo o bien en bins, mientras que las aplicaciones de hongos pueden ser al follaje o al suelo, principalmente.

4.3.1.- Pruebas con hongos.

Experimento 1. Las larvas neonatas de *C. pomonella* serán obligadas a caminar sobre hojas contaminadas con esporas, durante al menos un minuto. Posteriormente, serán transferidas con un pincel a una celda dentro de una placa de 96 pocillos, en la que encontrará dieta para alimentarse. Posteriormente, las larvas serán criadas en condiciones estándar y se registrará diariamente la mortalidad. Cada grupo de evaluación estará formado por 20 larvas y replicado 4 veces, es decir, 80 larvas por tratamiento (aislamiento), más un testigo. La dosis de esporas será de 10.000 esporas por cm². Las curvas de mortalidad de cada tratamiento serán comparadas mediante análisis de probit y los 3 mejores aislamientos pasarán a la siguiente fase de pruebas de campo.

Experimento 2. Las larvas de último estadio serán obligadas a caminar por al menos 40 cm de una sección de tronco de manzano o similar, tratada con esporas, antes de permitirles entrar en cartón corrugado. Una vez que hayan tejido su capullo, se esperará 10 días y se abrirá los capullos, para registrar si las larvas están vivas o muertas. Al igual que en el experimento anterior, cada grupo de evaluación estará formado por 20 larvas y replicado 4 veces, es decir, 80 larvas por tratamiento (aislamiento), más un testigo. La dosis de esporas será de 10.000 esporas por cm². Las curvas de mortalidad de cada tratamiento serán comparadas mediante análisis de probit y los 3 mejores aislamientos pasarán a la siguiente fase de pruebas de campo.

4.3.2.- Pruebas con nemátodos.

Larvas de último estadio de *C. pomonella* tendrán tablas que simulan madera de bins para encontrar grietas y tejer su capullo en ellas (Unruth y Lacey 2001). Las tablas serán sumergidas durante 30 seg en una suspensión con 1000 juveniles infectivos (IJ) de *Steinernema carpocapsae*. Las tablas serán almacenadas a 5° C, simulando la condición de una cámara de frío, y al cabo de 5 días se registrará la mortalidad de las larvas. Se utilizará 40 larvas por tratamiento y las medias de los tratamientos serán comparados mediante estadística paramétrica, si cumplen con los supuestos del ANDEVA, o con estadística (prueba de Kruskal-Wallis) en caso contrario.

4.4.- Pruebas de eficacia en campo.

Una vez concluidos los experimentos de laboratorio, se dispondrá de al menos 3 cepas de *M. anisopliae* y una de *S. carpocapsae* para ser evaluados en campo.

Las pruebas en campo se realizarán en parcelas de 9 árboles cada una, en las que se evaluará el árbol central de cada parcela. En todos los casos, el diseño utilizado será completamente al azar, con al menos 4 repeticiones. Las dosis a utilizar serán 10exp12 esporas/ha, en el caso de *M. anisopliae*, y de 300.000 IJ/ha en el caso de *S. carpocapsae*.

Experimento 1. Se realizará intentando controlar larvas neonatas con *M. anisopliae* entre fines de octubre e inicios de noviembre, con aplicaciones al follaje. Se repetirá en la segunda generación, es decir, entre enero-febrero. El efecto será evaluado midiendo el daño en fruta.

Experimento 2. Se realizará para controlar adultos con esporas de *M. anisopliae*. El momento de la aplicación será determinado de acuerdo a los datos de caída en trampas 10x. También se evaluará daño en fruta.

Experimento 3. Se evaluará el efecto del nematodo en las larvas invernantes y en las larvas de último estadio que caminarán sobre cajones con tierra infestada con el nematodo.

5.- ENSAYOS DE RESISTENCIA A INSECTICIDAS.

5.1.- Pruebas con larvas en estado de prepupa.

Se realizarán bioensayos de resistencia a insecticidas en larvas en estado de prepupa de la polilla de la manzana, separadas por sexo, provenientes de huertos sometidos a manejo tradicional, manejo orgánico y huertos abandonados de la VI región. Los insecticidas que se utilizarán en los bioensayos presentan registro vigente para el control de la polilla de la manzana en Chile:

Piretroides: se incluirán lambda-cialotrina y/o esfenvalerato.

Organofosforados: se utilizarán azinfosmetil, fosmet, clorpirifos y /o metidation.

Diacilhidrazinas: se incluirá metoxifenozide.

Neonicotinoides: se incluirá tiacloprid.

El número total de insecticidas bioensayados en cada huerto dependerá del total de larvas capturadas en las trampas, pero se estima que se recolectarán suficientes individuos como para realizar al menos los bioensayos de cinco insecticidas por huerto, privilegiando incluir productos con diferente grupo MOA (IRAC).

Las larvas serán extraídas de trampas de cartón corrugado, sexadas y reubicadas en cartón corrugado, al interior de potes plásticos. Luego de un período de dos meses a 2 ± 1 °C y fotoperíodo de día corto L12:O12, las larvas serán transferidas a 22 ± 1 °C y fotoperíodo de día largo (L16:O8) para inducir el término del estado de diapausa (Sauphanor et al. 2000). Debido a la gran cantidad de bioensayos de laboratorio (10 huertos con 5 insecticidas por cada uno), se utilizará la técnica de aplicación de una dosis diagnóstico para cada insecticida, correspondiente a la LC99 de una cepa susceptible de laboratorio (Pasquier and Charmillot 2003). Esta técnica se usa cuando se sospecha que la frecuencia de resistencia tiende a ser baja, ya que todos los individuos son sometidos a una dosis apropiada para establecer si son resistentes, sin “perder” individuos en dosis más bajas en las que el nivel de mortalidad no es informativo (ffrench-Constant and Roush 1990).

El bioensayo consiste en la aplicación tópica de 1 μ L de solución insecticida (ingrediente activo puro en solvente orgánico), con una micropipeta en la región dorsal de un mínimo de 40 larvas en estado de prepupa de cada sexo por insecticida, para cada uno de los huertos; incluyendo el solvente como tratamiento control para estimar su posible efecto tóxico. Inmediatamente después del tratamiento, se transferirán las larvas a placas Petri, en cuyo interior se depositarán previamente trozos de cartón corrugado (20 x 20 mm) y se incubarán a $25\pm 1^\circ\text{C}$, $40\pm 10\%$ de humedad relativa y fotoperíodo largo (L16:O8).

Las placas serán observadas diariamente para registrar la mortalidad (adultos no emergidos). Los valores de mortalidad total y por sexo de las larvas de cada huerto, serán comparados a través de la prueba de G, mientras que entre huertos sometidos a distintas formas de manejo se utilizará la prueba de Kruskal-Wallis (Sokal and Rohlf 1995).

5.2.- Pruebas con larvas neonatas.

Se realizará bioensayos de resistencia a insecticidas piretroides, organofosforados, benzoilureas y diacilhidrazinas en larvas neonatas de la polilla de la manzana, provenientes de huertos en que el bioensayo con larvas en prepupa haya indicado niveles significativos de resistencia.

Los bioensayos con larvas en estado de prepupa tienen la ventaja de ser aplicables a gran cantidad de muestras en forma rápida, pero presentan el inconveniente de estar basados sobre un estado de desarrollo que no es el objetivo de las aplicaciones de los insecticidas en los huertos (Sauphanor et al. 2000). Debido a esto, es necesario realizar ensayos con larvas neonatas (Knight et al. 1994). Este tipo de bioensayo requiere la obtención de adultos de terreno (machos y hembras), los que serán dispuestos en cajas con papel encerado para obtener huevos y luego larvas neonatas (Dunley and Welter 2000). En estas larvas se evaluarán las dosis letales 50 (LC50) de los insecticidas que sean detectados con niveles altos de resistencia en el bioensayo con larvas en estado de prepupa.

El bioensayo será realizado sobre dieta artificial para polilla de la manzana (Southland Products), utilizando larvas de 0-24 horas de edad (Sauphanor and Bouvier 1995). Se utilizarán microplacas con celdas con 100 μ l de dieta, sobre las cuales se agregará con micropipeta las diferentes concentraciones de insecticidas de formulación comercial. Luego de dejar secar al aire por dos horas, se ubicará una larva por contenedor, usando un pincel húmedo.

Se utilizarán al menos 120 larvas por insecticida para cada huerto, distribuidas en 5 concentraciones que induzcan entre 0 y 100% de mortalidad. Las larvas serán incubadas a $25\pm 1^\circ$ y fotoperíodo de día largo (L16:O8), registrándose la mortalidad después de 4 días para insecticidas neurotóxicos y 5 días para benzoilureas y diacilhidrazinas (Sauphanor and Bouvier 1995, Sauphanor et al. 1998, Sauphanor et al. 2000).

Las mortalidades corregidas de las larvas neonatas serán sometidas a un análisis Probit para estimar los valores de LD50 de cada huerto. Se compararán estas LD50 entre huertos sometidos a diferentes alternativas de manejo mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Sokal and Rohlf 1995)

6. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE POLILLAS PROVENIENTES DE DISTINTOS HUERTOS Y PROVINCIAS.

Procedimiento Molecular.

Se amplificarán en cada polilla cinco marcadores microsátélites aislados y descritos por Franck et al. (2005), los cuales ya han sido evaluados exitosamente en poblaciones de Chile (Espinoza et al. 2007, Franck et al. 2007). El ADN será extraído bajo el protocolo de "salting-out" moliendo el tejido en buffer de extracción TNES (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 400 mM, EDTA 20 mM, SDS 0,5%) e incubando en Proteinasa K (10 mg/mL) por toda la noche a 37°C . Las proteínas serán precipitadas por adición de NaCl 5M y subsecuentes centrifugaciones, recuperando de esa manera el sobrenadante. Este sobrenadante será sometido a lavados con etanol en distintas concentraciones, además de centrifugaciones y frío. Finalmente, el ADN será secado en estufa (37°C) y resuspendido en 50 μ L de agua ultrapura estéril. Las reacciones de PCR con los

partidores específicos de *C. pomonella* se prepararán de acuerdo a Franck et al. (2005), en volúmenes de reacción de 10 μ L, conteniendo Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 50 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada partidor, 0,5 U de Taq DNA polimerasa y 2 μ L de ADN extraído. Las amplificaciones serán realizadas con un termociclador MJ Research PTC-200 con las siguientes condiciones: un paso de denaturación inicial de 2 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos consistentes de 30 seg. a 94°C, 40 seg. a temperatura de annealing específica de 55-61 °C según cada partidor y 40 seg. a 72°C, además de un paso de extensión final de 3 min. a 72°C. Las amplificaciones serán resueltas por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6%, y visualizadas por tinción con nitrato de plata de acuerdo al protocolo del kit Silver Sequence. Los tamaños de cada banda serán registrados manualmente en comparación con un marcador pGEM®-3Zf(+) Vector, previamente analizado en el laboratorio y cargado en el mismo gel. La calidad de los datos será verificada mediante el programa Micro-checker (Van Oosterhout et al. 2004), ajustando los datos para su uso posterior en los análisis genético-poblacionales.

Interpretación de los datos.

Estadísticos básicos como el número promedio de alelos por locus, riqueza alélica por locus y por población serán obtenidos de las frecuencias alélicas de los marcadores microsatélites. Estimadores de heterocigocidad como FIS, HT, HS y GST serán calculados para cada locus polimórfico usando el programa FSTAT v.2.9.3 (Goudet 1995). También se utilizará un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) para calcular los componentes de varianza entre y dentro poblaciones [FST, heterocigosis observada (Ho), heterocigosis esperada (He) y desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W)], junto con comparaciones múltiples entre localidades. La prueba de diferenciación de poblaciones contra la hipótesis nula de uniformidad genética del AMOVA será corregida por el método secuencial de Bonferroni, basado sobre 1000 permutaciones de genotipos multilocus entre pares de poblaciones utilizando el programa ARLEQUIN v2.0 (Labate 2000, Schneider et al. 2000). Se estimará la frecuencia de alelos nulos (Na) para cada población respecto de los diferentes loci con el fin de evaluar si estos contribuyen a la significancia de la desviación H-W y valores FIS dentro de las poblaciones (Brookfield 1996). Esta frecuencia será calculada con la fórmula: $(He - Ho) / (He + Ho) - 1$, usando Ho y He (promediado por locus para cada población) estimados mediante el programa ARLEQUIN v2.0. Estimaciones del número de migrantes (Nm) entre pares de localidades por generación serán calculadas usando el algoritmo de Wright. Los valores de FST y distancia geográfica (km) entre pares de poblaciones serán correlacionados a fin de evaluar el grado de aislamiento por distancia utilizando regresión lineal simple y la prueba de Mantel para evaluar la correspondencia entre matrices de FST y distancia geográfica. Estos datos también serán analizados desde una perspectiva Bayesiana con el software Structure (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003). Finalmente, los huertos analizados en esta escala regional serán referenciados geográficamente, lo que en conjunto con la genotipificación multilocus de los individuos recolectados, permitirá delinear el dominio espacial de las poblaciones con el software Geneland (Guillot et al. 2005).

Evaluación la actividad enzimática de oxidasas de función múltiple (OFM), glutatión-s-transferasas (GST) y esterasas en adultos de la polilla de la manzana.

La actividad de enzimas OFM, GST y EST será evaluada en polillas adultas emergidas de cada uno de los huertos estudiados. Las mediciones de actividad de EST se realizarán a través de luminometría, mientras para las GST y MFO se realizarán a través de fluorimetría, utilizando en ambos casos un lector de microplacas Victor 3 Perkin Elmer. Para los análisis de actividad de GST se homogenizarán individualmente los abdómenes de las polillas en 150 μ L de buffer Hepes 50mM (pH 7,0) (Nauen and Stumpf 2002), siendo posteriormente, centrifugados por 15 minutos a 4°C y 15.000 g, usando el sobrenadante como fuente de enzima (Bouvier et al. 2002). La determinación de la actividad de GST se realizará en microplacas negras con monoclorobimano (MCB) como sustrato (Nauen and Stumpf 2002). En cada celda se incluirá 30 μ L de extracto enzimático (equivalente a 0,2 abdómenes), 168 μ L de glutatión reducido 100 mM (GSH) en buffer Hepes 50 mM y 2 μ L de MCB 30mM. Para los controles se utilizará buffer en lugar de extracto enzimático.

La placa será incubada a 22 °C por 20 minutos, luego de los cuales se medirá la fluorescencia a 380 nm de excitación y 465 nm de emisión. Debido a que el complejo GSH-bimano no se encuentra comercialmente disponible, los resultados se expresarán en unidades de fluorescencia insecto-1 (Nauen and Stumpf 2002). La actividad de OFM en tejido intacto, se determinará a través de la actividad de 7-etoxicumarina-O-desetilación (ECOD) (De Sousa et al. 1995). Para ello, los abdómenes disectados de los insectos se dispondrán individualmente en celdas de microplacas negras, conteniendo 100 µL de buffer fosfato 50 mM (pH 7,2) y etoxicumarina 0,4 mM. En el caso de los controles, se agregará el mismo volumen de buffer glicerina/etanol (v/v) (10-4M), para evitar la reacción. Después de cuatro horas de incubación a 30°C, se detendrá la reacción en el resto de la placa agregando 100 µL de buffer glicerina/etanol (v/v) (10-4M). Finalmente, se medirá la fluorescencia de las muestras a 380 nm de excitación y 465 nm de emisión (Bouvier et al. 1998, Bouvier et al. 2001).

La actividad de esterases totales será medida en microplacas, usando β-naftil acetato como sustrato (Bouvier et al. 2002). A cada celdilla, conteniendo buffer fosfato 50mM (pH 6,5) más 0,1 mM β-naftil acetato, se agregarán 0,5 µL de extracto enzimático más 89,5 µL de buffer Hepes 50mM (pH 7,0). Esta reacción será incubada a 30 °C por 15 minutos, luego de los cuales se detendrá agregando 20 µL de una solución reactiva compuesta por 3 g/L de Fast Garnet y 35 g/L de sodio dodecil sulfato. Celdas con buffer de extracción en lugar de enzima, serán usadas como control. La absorbancia del complejo Naftol-Fast Garnet, se medirá después de 15 minutos a 490 nm (Bouvier et al. 2002).

7. EVALUACIÓN LA PRESENCIA DE LA MUTACIÓN KDR EN EL CANAL DE SODIO Y ACETILCOLINESTERASA INSENSIBLE EN INDIVIDUOS DE LA POLILLA DE LA MANZANA.

La presencia de estas mutaciones responsables de la resistencia a insecticidas será identificada por Amplificación Bidireccional Selectiva de Alelos por PCR (Bi-PASA). A partir del ADN extraído de los individuos recolectados se procederá a realizar por separado la amplificación selectiva según la metodología descrita para el gen *kdr* por Brun-Barale et al. (2005) y para la acetilcolinesterasa insensible por Casanelli et al. (2006).

En el caso del gen *kdr* las reacciones de PCR con los partidores específicos CKDR1, CKDR2, CARPO1 y CARPO4 serán preparadas en volúmenes de reacción de 25 µL, conteniendo Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0.125 µM de cada partidador, 1 U de Taq DNA polimerasa y 1 µL de ADN extraído. Las amplificaciones serán realizadas con un termociclador Eppendorf con las siguientes condiciones: un paso de denaturación inicial de 2 min. a 94°C, seguido de 40 ciclos consistentes de 30 seg. a 94°C, 45 seg. a temperatura de annealing de 60 °C y 45 seg. a 72°C. Las amplificaciones serán resueltas por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, y visualizadas por tinción con bromuro de etidio. Los tamaños de cada banda serán registrados manualmente en comparación con un marcador de 100 pares de bases Smartladder cargado en el mismo gel. La aparición de una banda de 148 pares de bases indica la presencia del gen con la mutación *kdr*, mientras la presencia de una banda de 296 pares de bases indica la presencia del gen silvestre (aparecen ambas bandas en los individuos heterocigotos) (Brun-Barale et al. 2005).

En el caso del gen con la mutación de acetilcolinesterasa insensible las reacciones de PCR con los partidores específicos F-ctrl, R-ctrl, F-wt y R-mt serán preparadas en volúmenes de reacción de 25 µL, conteniendo Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 15 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 10 pM de los partidores F-ctrl y R-ctrl, 5 pM de los partidores F-wt y R-mt, 2 U de Taq DNA polimerasa y 150 ng de ADN extraído. Las amplificaciones serán realizadas con un termociclador Eppendorf con las siguientes condiciones: un paso de denaturación inicial de 2 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos consistentes de 20 seg. a 94°C, 20 seg. a temperatura de annealing de 58.5 °C y 40 seg. a 72°C. Las amplificaciones serán resueltas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, y visualizadas por tinción con bromuro de etidio. Los tamaños de cada banda serán registrados manualmente en comparación con un marcador de 100 pares de bases Smartladder cargado en el mismo gel. La aparición de una banda de 427 pares de bases

indica la presencia del gen con la mutación acetilcolinesterasa insensible, mientras la presencia de una banda de 325 pares de bases indica la presencia del gen silvestre (aparecen ambas bandas en los individuos heterocigotos) (Cassanelli et al. 2006, Reyes et al. 2007).

ESTUDIO DEL CICLO DE CYDIA POMONELLA EN CAMPO Y RELACIÓN CON ACUMULACIÓN DE TEMPERATURA.

La metodología es una adaptación de las metodologías usadas por Kührt et al. 2006a, 2006b y 2006c. Para estudiar el ciclo biológico de la polilla de la manzana se establecerá bioestaciones, es decir, árboles de manzano que están rodeados por una estructura metálica que soporta una malla de tul o malla anti-áfidos. Cada bioestación se infesta artificialmente con un número conocido de polillas y se monitorea la aparición y duración de cada ciclo durante el año.

Dependiendo del mes en que efectivamente se reciban los recursos y se inicie el proyecto, la infestación se realizará con larvas diapausantes capturadas en bandas de cartón o bien con adultos. En ambos casos, las polillas que se ingresarán a la bioestación corresponden a polillas colectadas en árboles vecinos y en ningún caso se moverán polillas entre huertos diferentes (Kührt et al. 2006a).

Dado que la temperatura es el factor más importante para el desarrollo del ciclo, ésta será registrada mediante un datalogger dentro de la bioestación. Es posible que la malla altere en algo la temperatura entre el interior y el exterior, por lo cual se colocará otro datalogger en la parte exterior para poder comparar las eventuales diferencias de temperaturas y tomar medidas correctivas (Kührt et al. 2006c).

Los adultos se capturarán con trampas de codlemona (machos) y de éster de pera (hembras, Light y Knight 2001). Los huevos serán buscados en los frutos y las hojas cercanas (primera generación) o sólo en los frutos (segunda generación). Para determinar cuándo pupan las larvas, se usará bandas de cartón.

Cada evento de interés (vuelo de machos, vuelo de hembras, ovipositura, eclosión de huevos) se correlacionará por separado con cada una de las siguientes variables:

Temperatura media del día

Acumulación de grados día en base 10.

Temperatura promedio entre las 20:00 y las 24:00 horas.

Las correlaciones y su significancia estadística serán calculadas en los programas SPLUS y SPSS.

También se realizará un análisis multivariado para analizar los datos en el programa CANOCO.

Las bioestaciones será ubicadas en un huerto de la VI por definir, un huerto en Colín, Talca y el huerto de Santa Rosa, Chillán, los dos últimos para efectos de comparación.