

**NOMBRE DEL PROYECTO.**

Desarrollo del control etológico y biológico para escarabajos de la corteza del pino.

**ZONA GEOGRÁFICA DE EJECUCIÓN.**

Regiones Séptima, Octava, Novena y Décima.

**INSTITUCIONES RESPONSABLES DE LA EJECUCIÓN.****AGENTE POSTULANTE. RESPONSABLE DEL PROYECTO:**

**NOMBRE O RAZÓN SOCIAL:** Controladora de Plagas Forestales S.A.

**INSTITUCIÓN ASOCIADA PARA LA EJECUCIÓN:**

**NOMBRE O RAZÓN SOCIAL:** Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)

**INSTITUCIÓN ASOCIADA PARA LA EJECUCIÓN:**

**NOMBRE O RAZÓN SOCIAL:** Universidad De Concepción

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

COSTO TOTAL	\$450.181.263.-	100%
APORTE FONDO	\$238.210.885.-	53%
APORTE POSTULANTE	\$211.970.378.-	47%

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

FECHA DE INICIO	1 de marzo de 2008
FECHA DE TÉRMINO	29 de febrero de 2012
DURACIÓN DEL PROYECTO (MESES)	48

## PROPÓSITO, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECIFICOS.

### Hipótesis

Los escarabajos de la corteza *Hylurgus ligniperda* e *Hylastes ater* interactúan químicamente con sus hospederos, respondiendo olfativamente a los semioquímicos emitidos por estos y son susceptibles al ataque de hongos entomopatógenos.

### Objetivo general

Desarrollar un sistema de monitoreo y control biológico de *Hylurgus ligniperda* e *Hylastes ater* basado en el uso de semioquímicos y hongos entomopatógenos, con el fin de reducir la presencia de estos escolítidos en puertos y recintos forestales.

### Objetivos específicos

1. Aislar, identificar y evaluar la actividad biológica en *H. ligniperda* y *H. ater* de los compuestos volátiles emitidos por el follaje, tocones y madera aserrada de *P. radiata*.
2. Aislar, identificar y evaluar la actividad biológica de los compuestos volátiles emitidos por machos y hembras de *H. ligniperda* y *H. ater*.
3. Prospeccionar, seleccionar y evaluar aislamientos de hongos entomopatógenos específicos para el control y/o manejo de *H. ligniperda* y *H. ater*.
4. Evaluar trampas y dispositivos que incorporen los compuestos identificados como atrayentes, así como también, aislamientos de hongos entomopatógenos
5. Transferir los resultados obtenidos por el Proyecto.

## RESULTADOS ESPERADOS AL FINALIZAR EL PROYECTO.

1. Al menos un compuesto semioquímico atrayente para *Hylurgus ligniperda* y/o *Hylastes ater*.
2. Al menos un aislamiento de hongo patogénico para *Hylurgus ligniperda* y/o *Hylastes ater*.
3. Prototipo de dispensadores de atrayentes y hongos entomopatógenos para incorporarlos en trampas comerciales para el control de los escolítidos del pino
4. Propuesta de un protocolo de monitoreo y control de los escarabajos de la corteza del pino aplicable a puertos y recintos forestales.

## **BENEFICIOS DEL PROYECTO.**

1. Detección temprana de situaciones de riesgo con escolítidos en puertos y recintos forestales.
2. Optimización de la aplicación de medidas de control.
3. Disminución de los riesgos de rechazo de exportaciones de productos forestales terminados.
4. Disminución del riesgo de cierre de mercados, por transporte no deseado de escolítidos del pino, en embarques comerciales a otros países.
5. Implementación de un sistema de monitoreo, basado en sustancias ambientalmente aceptables (semioquímicos).
6. Implementación de un sistema de control biológico, basado en organismos ambientalmente aceptables.

## **BENEFICIARIOS(AS) DIRECTOS(AS) DEL PROYECTO.**

1. Aserraderos.
2. Plantas de celulosa.
3. Empresas forestales.
4. Plantas de remanufactura.
5. Industrias de tableros, paneles y puertas.
6. Fabricas de papel.
7. Puertos.

## **DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LA METODOLOGÍA**

### **Obtención de compuestos semioquímicos**

- a) Colección de volátiles de pino, mediante columnas de adsorción SPME. Se encapsularan en campanas de vidrio ramas, tocones o madera. En las campanas se inserta la jeringa de micro-extracción y se deja para adsorción de los volátiles. El tiempo de muestreo se determinará experimentalmente. Las jeringas cargadas de material se guardan en frío hasta el análisis.
- b) Colección de volátiles pino, mediante Headspace con columnas de adsorción de Porapak Q y Tenax TA. Se encapsularan en campanas de vidrio ramas, tocones o madera y se colectaran los volátiles por un periodo de 24 horas. Luego los volátiles serán extraídos desde las columnas mediante solvente (hexano, eter). Las muestras

serán almacenadas en ampollas de vidrio para su posterior análisis y realización de bioensayos.

- c) Preparación de extractos por arrastre con vapor de agua. Muestras de 250 g de acículas se triturarán en una juguera y se extraerán con dos litros de agua a ebullición. Los compuestos orgánicos se separarán del destilado por extracción con diclorometano. Las fases orgánicas se secarán con sulfato de sodio y se guardarán en viales de vidrio sellados, en frío y en oscuridad hasta el análisis y ejecución de bioensayos.
- d) Preparación de extractos con solventes orgánicos. Muestras de 250 g de acículas y 500 ml de solvente se mezclan en una juguera y se deja lixiviar por tres días. Se utilizarán tres solventes de polaridad diferente: hexano, diclorometano, etanol. Los extractos se secarán y filtrarán. Luego se guardarán en viales y ampollas de vidrio en oscuridad y frío hasta su análisis y realización de bioensayos.

#### **Actividades asociadas**

- 1.1 Selección de los materiales (tocones, ramas, madera) para la obtención de los extractos y volátiles.
- 1.2 Obtención de extractos y volátiles.
- 1.3 Preparación y almacenamiento de muestras.
- 1.4 Colecta de insectos en terreno.
- 1.5 Traslado y mantención de los insectos en laboratorio.
- 1.6 Análisis electroantenográfico.
- 1.7 Identificación mediante GC-MS, inyección de estándares, calculo de índice de Kovats y comparación con librerías de espectros de masa.
- 1.8 Bioensayos olfativos.

- e) Colección de volátiles de escolítidos, SPME y Headspace. Se encapsularan en campanas de adultos de *H. ligniperda* y *H. ater*. En las campanas se inserta la jeringa de micro-extracción (SPME) o columna (Headspace) para colectar los volátiles. El tiempo de muestreo se determinará experimentalmente. Las jeringas cargadas de material se guardan en frío hasta el análisis, las columnas serán desorbidas con solventes y almacenadas en ampollas para su posterior análisis y realización de bioensayos.

#### **Actividades asociadas**

- 2.1. Colecta de insectos en terreno.
- 2.2. Traslado y mantención de los insectos en laboratorio.
- 2.3. Obtención de extractos y volátiles.
- 2.4. Preparación y almacenamiento de muestras.
- 2.5. Análisis electroantenográfico.
- 2.6. Identificación mediante GC-MS, inyección de estándares, calculo de índice de Kovats y comparación con librerías de espectros de masa.
- 2.7. Bioensayos olfativos

### **Identificación y análisis de la actividad biológica de los extractos y volátiles**

Los compuestos presentes en los extractos y volátiles se analizarán por cromatografía de gases con detección electroantenográfica. Los compuestos activos serán identificados por cromatografía de gases con detección de masas, comparación con bibliotecas de espectros, co-inyección de estándares y cálculo del índice Kovats.

### **Hongos entomopatógenos**

Los aislamientos de entomopatógenos se obtendrán mediante prospección y por selección de aislamientos desde la colección de INIA-Quilamapu.

La prospección se realizará en zonas con presencia de *H. ligniperda* y *H. ater* en bosques de pino y de escolítidos nativos en bosques nativos pertenecientes al patrimonio de las empresas asociadas al proyecto en las regiones VII a X.

Para la selección de los aislamientos se emplearán a lo menos 200 aislamientos desde la colección de INIA-Quilamapu. La activación de los aislamientos de la colección se realizará cultivo sobre placas (Ø90 X 15 mm) con PDA (39 g L<sup>-1</sup>). Posteriormente para la obtención de inóculo se transferirá un disco de micelio (5 mm) desde el cultivo hacia placas con PDA, las que serán incubadas en oscuridad a 25°C hasta completar la placa. Las conidias se colectarán adicionando 15 mL de agua destilada estéril a cada placa y removiendo suavemente con un pincel las conidias desde la superficie de la colonia y su concentración será determinada mediante hemacitometro. Una suspensión de 1 X 10<sup>6</sup> conidias/mL será utilizada para realizar la selección de los aislamientos. Aquellos aislamientos que produzcan la mayor mortalidad y esporulación sobre los cadáveres serán seleccionados para las pruebas siguientes. Con los aislamientos seleccionados, se prepararán suspensiones a diferentes dosis de inóculo (10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> esporas/ml). Estas serán aplicadas, utilizando una torre de pulverización sobre los insectos. Diariamente se evaluará la mortalidad de individuos. Con la respuesta de mortalidad se realizarán las curvas de regresiones para calcular dosis letales (DL90) y tiempos letales (TL90), de manera de estimar las posibles dosis para aplicaciones de campo.

### **Actividades asociadas**

- 3.1 Activación de los aislamientos.
- 3.2 Colecta de insectos en terreno.
- 3.3 Traslado y mantención de los insectos en laboratorio.
- 3.4 Selección de aislamiento patogénico.
- 3.5 Determinación de DL90 y TL90.
- 3.6 Formulación de dosis para aplicación en terreno
- 3.7 Evaluación de mortalidades asociadas a la aplicación
- 3.8 Evaluación de sobrevivencia de poblaciones de hongos entomopatógenos

### **Bioensayos**

Los extractos crudos y los compuestos identificados serán sometidos a bioensayos olfatométricos (Túnel de viento, Olfatometros tipo "Y" y de Petersson) para determinar su actividad biológica y la respuesta conductual de los escolítidos (Atracción, repelencia, interferencia). Posteriormente se obtendrán las curvas dosis-respuesta de los compuestos activos.

**Ensayos de campo**

Los compuestos atrayentes en su dosis óptima serán evaluados en campo mediante trampas que incorporaran los aislamientos entomopatógenos seleccionados en las etapas anteriores. Las trampas serán instaladas en bosques, aserraderos y puertos.

**Actividades asociadas**

- 4.1 Determinación de curvas dosis-respuesta.
- 4.2 Selección de trampas y compuestos semioquímicos.
- 4.3 Evaluación en terreno.

**Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en los bioensayos de laboratorio y campo serán sometidos a análisis estadístico. Dadas las características de los datos que se obtienen en este tipo de experimentos se emplearan, principalmente, procedimientos no-paramétricos como Friedman, Kruskal-Wallis, Chi-cuadrado y G-test.