

PROTOCOLO

Evaluación de la eficacia de feromona sintética de *Lobesia botrana* (Denis&Schifferrmüller) en ensayos de campo en vid, arándanos y ciruelo, con infestación controlada.

Programa Nacional de *Lobesia botrana* (PNLb)

Septiembre de 2021

1. Introducción

El presente protocolo para la evaluación en campo de la eficacia de feromona sintética para el control de *Lobesia botrana*, está basado en metodologías desarrolladas para la evaluación de la confusión sexual de esta y otras plagas de polillas de frutales (Lepidóptera: Tortricidae) en vid y otros hospederos frutales.

2. Objetivo

Evaluación de un emisor de feromona sexual sintética con el objeto de determinar su eficacia y período de protección de confusión sexual sobre *Lobesia botrana*, bajo condiciones edafoclimáticas de campo nacionales.

El SAG evaluará los resultados generados por la estación experimental conductora de los ensayos para autorizar el uso del emisor de feromona en la lista de productos para el control de la plaga.

3. Alcance

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 registrarse por las directrices, el presente protocolo y sus anexos.

Antecedentes generales

Se deberán proporcionar al SAG todos los documentos especificados en las directrices, incluyendo:

- Formulario de solicitud de ingreso de muestra de plaguicida para experimentación (directrices para ensayos de CS).
- Identificación del supervisor de la investigación.
- Empresas químicas y dispositivos a evaluar.
- Identificación, ubicación y georreferencia de la Estación Experimental o huerto comercial (incluir mapa).
- Fecha estimada de inicio y término de los ensayos.

4. Definiciones

- **Tratamiento del ensayo:** Evaluación de un emisor de feromona con el objeto de determinar su eficacia y período de protección sobre *Lobesia botrana*, bajo condiciones edafoclimáticas nacionales, el cual debe estar autorizado por el SAG.
- **Tratamiento control (Testigo):** Se trata de un tratamiento sin instalación de emisores de feromona.
- **Tratamiento control comercial:** corresponde a un tercer tratamiento consistente en un producto comercial ya autorizado por el SAG cuyos resultados de evaluación pueden ser utilizados como referencia en el análisis de los resultados del ensayo. Este tratamiento no es obligatorio y puede ser implementado bajo el criterio del investigador a cargo.
- **Jaula:** Estructura rígida con marco de madera o metal, cubierta de malla u otro material en donde se realizará la liberación de adultos de *Lobesia botrana*.

5. Condiciones experimentales

5.1 Cultivo: *Vitis vinífera*

Los ensayos podrán ser realizados en cualquier variedad de vid de mesa o vinificación, arándanos o ciruelo, de acuerdo a la disponibilidad en cada Estación Experimental o huerto comercial.

5.2 Organismo plaga: *Lobesia botrana*

Los estados corresponderán a:

- a) Hembras adultas. Para cada infestación se deberán utilizar hembras vírgenes de no más de 3 días de edad, obtenidas de un laboratorio o estación experimental autorizados por el SAG.

- b) Machos adultos: Para cada infestación se deberán utilizar machos vírgenes de no más de 3 días de edad, obtenidas de un laboratorio o estación experimental autorizados por el SAG.

El estado a controlar corresponde a adultos, pues la metodología de control es a través de la confusión sexual, evitando o afectando la cópula y la fertilización de las hembras. Este efecto será evidenciado a través de la disminución de la captura de machos en trampas cebadas con hembras vírgenes ubicadas dentro de las jaulas

La edad de los individuos a utilizar está determinada por la vida útil de este estado, que en condiciones de laboratorio fluctúa entre 10 a 12 días.

5.3 Origen del material biológico: crianza artificial de un laboratorio autorizado por el SAG

5.4 Antecedentes del huerto

- Variedad,
- Sistema de conducción,
- Superficie del ensayo y cuartel,
- Marco de plantación,
- Plan de manejo de *Lobesia botrana*
- Plan de manejo para otras plagas

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

- fertilización,
- porta injerto,
- edad de las plantas,
- altura de las plantas.
- Altitud (msnm)

5.5 Diseño experimental

El supervisor de la investigación deberá seleccionar el diseño dependiendo de la condición del huerto seleccionado.

El diseño experimental podrá corresponder a:

- a. Diseño completamente al azar

Se deberán tomar dos unidades de 4 ha de superficie, con una distancia entre ellas no menor a 300 metros manteniendo las mismas condiciones agroclimáticas entre ellas. Cada unidad de superficie corresponderá a un tratamiento. Dentro de cada tratamiento se deberán montar 4 jaulas para realizar

las infestaciones en forma simultánea, correspondiendo así cada jaula a una repetición.

Tratamiento: unidad de superficie de 4 ha. Cada unidad podrá tener una superficie menor a 4 ha, esto previo acuerdo de la empresa solicitante y autorizado por el investigador a cargo del ensayo.

Repetición: jaula

Unidad experimental: 1 jaula con los insectos en estado adulto de *Lobesia botrana* liberados en su interior.

b. Diseño en bloques al azar

Se deberán tomar dos unidades de 4 ha de superficie, con una distancia entre ellas no menor a 300 metros manteniendo las mismas condiciones agroclimáticas entre ellas. Cada unidad de superficie corresponderá a un tratamiento en una localidad. Dentro de cada tratamiento se deberán montar 4 jaulas para realizar las infestaciones en forma simultánea.

Tratamiento: unidad de superficie de 4 ha. Cada unidad podrá tener una superficie menor a 4 ha, esto previo acuerdo de la empresa solicitante y autorizado por el investigador a cargo del ensayo.

Unidad experimental/repetición: 1 jaula con los insectos en estado adulto de *Lobesia botrana* liberados en su interior

Cada jaula deberá contar con las medidas de bioseguridad y sujeción correspondientes para evitar la fuga de los individuos. El material de construcción podrá ser madera o metal. Las dimensiones sugeridas para la jaula, según antecedentes bibliográficos (Doye E. y Koch U., 2005), podrán ser 2.3 x 2.3 x 1.6 metros.

La ubicación específica y orientación de la jaula deberá ser definida por el investigador a cargo del estudio, debiendo especificar los argumentos técnicos.

5.6 Metodología

Esta metodología ha sido aplicada en el estudio de distintas especies de lepidópteros asociados a hospederos como vides y pomáceas, registrando capturas en los tratamientos testigos sobre un 56%, fluctuando mayormente entre 81% y 66%. Los valores observados en los tratamientos aplicados registran resultados de captura entre 2% y 5%.

El ensayo se considerará iniciado una vez sean instalados los emisores de confusión sexual y/o instaladas las jaulas y corroboradas las condiciones de bioseguridad. Previo al inicio del ensayo se deberá informar cual será el laboratorio que provea de los insectos para el ensayo.

El material para las infestaciones será preparado por personal del equipo del investigador a cargo en dependencias del laboratorio de crianza que proveerá del

material. Una vez preparado el material de infestación deberá ser transportado al lugar del ensayo con las medidas de bioseguridad pertinentes dentro de un dispositivo con sistema de climatización autónoma.

La cantidad de hembras a utilizar en cada infestación será de 2 hembras. La cantidad de insectos podrá ser superior, en acuerdo con el investigador y dependiendo de la calidad del material que se utilice. En cada liberación se podrán utilizar entre 50 y 100 machos. La cantidad de insectos a liberar deberá ser definida por el investigador en acuerdo con la empresa solicitante, bajo la premisa de no comprometer los resultados de la evaluación.

Las hembras serán confinadas dentro de una cápsula de malla metálica (utilizada para infusiones). Cada capsula tendrá 2 o más hembras vírgenes de 3 días de edad como máximo. La cápsula será ubicada dentro de una trampa delta con piso adhesivo el que deberá ser removido en cada evaluación y sustituido por uno nuevo (Figura 1). Se podrá usar más de una trampa delta en el interior de la jaula si el investigador a cargo del ensayo lo considera necesario.

Una vez instalada la trampa delta con las hembras en su interior, se procederá a liberar los insectos en estado adulto de no más de 3 días de edad.

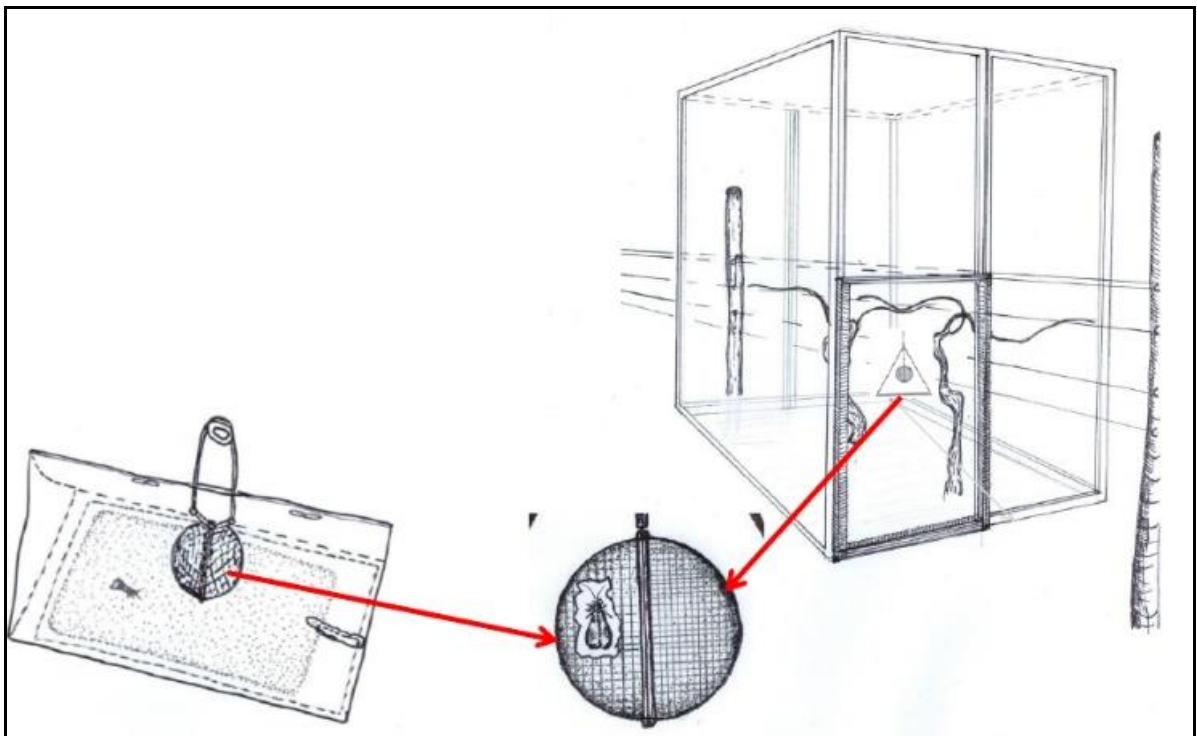


Figura 1. Jaula de infestación para evaluación en campo de disrupción sexual y capsula de confinamiento de hembras en trampa delta (Doye E. y Koch U., 2005).

Las infestaciones se podrán realizar en los momentos que el investigador considere necesario, cumpliendo con un mínimo de 3 infestaciones durante el transcurso del ensayo (una inicial y 2 posteriores para validar el tiempo de protección del producto). En

cada infestación se deberá liberar la misma cantidad de individuos y reponer la capsula con hembras, modificable de acuerdo al criterio del investigador.

6. Modo de evaluación, registro y mediciones

La evaluación consistirá en la remoción del piso de la trampa delta para ser evaluado en condiciones de laboratorio por personal calificado para identificar los individuos capturados y cuantificarlos.

El número de evaluaciones durante cada infestación deberá ser definido por el investigador a cargo del ensayo. La duración del ensayo deberá ser acorde al periodo de protección solicitado por la empresa representante.

La determinación de la eficacia del tratamiento (**P**) será calculada con la siguiente formula:

P= Eficacia de disrupción del apareamiento

$$P = 100 - Q$$

Q= Tasa de recaptura

Rv= recaptura en jaula con tratamiento

Rk= recaptura en jaula testigo

$$Q = Rv / Rk * 100$$

Una vez calculada la tasa de recaptura en cada jaula del tratamiento del ensayo y el control, se procederá a realizar el análisis estadístico de los datos.

8. Análisis de datos y presentación de los resultados

Para el análisis estadístico del resultado de la tasa de captura, se deberán tomar los datos de todos los tratamientos y todos los momentos en que se realizaron las infestaciones. No deberán eliminarse datos.

Los análisis deberán entregarse en el anexo del informe final, incluyendo una ficha resumen indicando los valores observados (Formato en anexo 3).

Para el caso que el análisis estadístico requiera transformaciones de datos, estos deberán venir debidamente justificados.

Una vez finalizado el ensayo se requerirán toda la data cruda generada, en formato Excel.

9. Plazos de ejecución de ensayos y entrega de informes finales

Los ensayos podrán iniciarse hasta el 15 de noviembre y deberán **estar concluidos al 30 de abril** y el plazo máximo de entrega de resultados será el **31 de mayo**.

10. Información meteorológica

Se deberán registrar los datos meteorológicos que puedan afectar la calidad y la persistencia del tratamiento tanto dentro como fuera de la jaula, por lo que se deberán registrar las condiciones ambientales de cada parcela de tratamiento. Esto incluye considerar las condiciones ambientales al momento de la infestación registrando al menos precipitaciones (cantidad en mm), temperatura (media, máxima, mínima en °C), humedad relativa en el cuartel, viento (velocidad y dirección).

En caso de presencia de alguna condición meteorológica de riesgo para el ensayo, como temperaturas altas extremas, precipitaciones, etc., queda bajo criterio del investigador la suspensión o eliminación de las actividades, debiendo dar aviso al PNLb.

11. Análisis de los resultados obtenidos

Una vez realizadas las mediciones y analizados los resultados, el investigador a cargo deberá concluir con su recomendación sobre el emisor de feromona para su uso comercial.

ANEXOS

Anexo 1. Medidas de bioseguridad a implementar en los ensayos para probar la eficacia de insecticidas en campo (elaboradas por el Servicio Agrícola y Ganadero)

1. Sobre el lugar del Ensayo:
 - El predio debe ubicarse dentro del área 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.

2. Requerimientos de bioseguridad
 - Se deberá entregar un mapa con la ubicación de el o los predios y sectores del ensayo (coordenadas geográficas y polígonos, identificando tratamientos, repeticiones y testigo).
 - El material que se utilizará para la cubierta de la jaula deberá ser determinado por el investigador a cargo, manteniendo las condiciones de bioseguridad para evitar el escape de los insectos desde el interior de la jaula. El material recomendado es malla metálica de una trama no superior a 1.2mm. El investigador a cargo podrá solicitar utilizar otro material sin comprometer los resultados del ensayo.
 - La estructura de la jaula deberá ser madera, metal u otro material recomendado por el investigador, y deberá contar con un sistema de anclaje al suelo para evitar desplazamiento o elevación frente a condiciones de viento.
 - 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 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.
 - El SAG determinará realizar un tratamiento con aplicaciones químicas con los productos autorizados por el Control Oficial, en todo el sector donde se realizó el estudio en el caso de presentarse algún problema con las medidas de bioseguridad de las jaulas.
 - 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 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 realizarán las infestaciones con al menos 15 días hábiles de anticipación. Comunicar al correo maria.oyarzun@sag.gob.cl y edith.fuentes@sag.gob.cl
- La institución ejecutante de los ensayos deberá contar con un registro de las fechas en que se realice la instalación de los dispositivos, la densidad por hectárea, y estado del material al momento de realizar la instalación y otros. Estos registros deben estar disponibles en todo momento para los fiscalizadores del SAG.

4. Sobre el traslado del material parental:

Para el traslado desde laboratorio a huerto, los tubos con las polillas se deben colocar en un dispositivo con autonomía para la regulación de temperatura 2-4°C durante el traslado. Luego el dispositivo 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 (maria.oyarzun@sag.gob.cl, edith.fuentes@sag.gob.cl) con 48 horas de anticipación.

Anexo 2. Ficha resumen

Valores observados y productos son a modo de ejemplo

Empresa:	SAG
Tratamientos (Producto/ia)	Emisor LB Testigo no tratado
Dosis (Densidad) Ejecutante	500 /Ha Estacion Experimental
Fecha instalacion de emisores	15/08/2017

Variable evaluada	Medición del período residual							
	15 días después de instalacion		30 días después de instalacion		45 días después de instalacion		X días después de la aplicación	
	Emisor LB	Testigo	Emisor Lb	Testigo	Emisor LB	Testigo	Emisor LB	Testigo
Nº de individuos en trampa	2 a	78 b	3 a	75 b	5 a	80 b		
Tasa de recaptura (Q)	2,6		4		6,3			
Eficacia en disrupcion (P)	97,4		96,0		93,80			

Literatura citada

Doye, E. 2006: Entwicklung eines Freilandtests zur Überprüfung der Wirksamkeit von Pheromonanwendungen im Weinbau. Dissertation Universität Kaiserslautern.

Hoffmann, C., Doye, E. 2017 How to measure mating disruption efficacy of pheromone products for registration for purposes in the field?

Briand, F., Guerin, P., Charmillot, P., Kehrl, P., 2011. Small cages with insect couples provide a simple method for a preliminary assessment of mating disruption. The scientific world journal 2012