

Tesis Doctoral

Aislamientos de *Beauveria bassiana* y
Metarhizium anisopliae virulentos para el
control del picudo del algodnero,
Anthonomus grandis (Coleoptera:
Curculionidae)

Nussenbaum, Ana Laura

2014

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Nussenbaum, Ana Laura. (2014). Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodnero, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Nussenbaum, Ana Laura. "Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodnero, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Ana Laura Nussenbaum

Director de Tesis: Dr. Roberto E. Lecuona

Consejero de Estudios: Dra. Viviana Confalonieri

Lugar de trabajo: Laboratorio de Hongos Entomopatógenos, IMyZA, CICVyA, INTA.

Buenos Aires, Noviembre de 2013

Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae)

Resumen

El picudo del algodón, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), es considerado una de las plagas más importantes de algodón en América, presente en Argentina desde 1993. El objetivo general del trabajo fue seleccionar aislamientos nativos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) virulentos para el picudo del algodón. Para ello se obtuvieron aislamientos nativos provenientes de muestras de suelo e insectos, así como cepas pertenecientes a la micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (IMYZA, INTA). Se evaluó la patogenicidad y virulencia de 28 aislamientos de *M. anisopliae* y 66 aislamientos de *B. bassiana* sobre adultos de picudo y se estudiaron los efectos subletales sobre la alimentación y oviposición producidos por estos hongos. Por otro lado, fueron evaluadas distintas características de los aislamientos seleccionados, como la compatibilidad con los insecticidas químicos utilizados en campo, el efecto conjunto de los insecticidas químicos y los aislamientos sobre la plaga, y la tolerancia a altas temperaturas de los aislamientos. Finalmente, se evaluaron parámetros de producción masiva de conidios de los aislamientos seleccionados y se realizaron evaluaciones en campo de las formulaciones experimentales. Los aislamientos de *M. anisopliae* (Ma 50 y Ma 20) resultaron los más virulentos donde la concentración letal media fue $1,13 \times 10^7$ y $1,20 \times 10^7$ conidios/ml, respectivamente. Además, se encontró una disminución en la alimentación de las hembras infectadas con los aislamientos Ma20 y Bb23, y una disminución de la oviposición con Ma 20. Por otro lado, los aislamientos de *M. anisopliae* evaluados fueron compatibles con los insecticidas piretroides y más tolerantes a temperaturas altas. Los resultados obtenidos indican la posibilidad de utilizar *M. anisopliae* como agente de control microbiano incluyéndolo en un programa de Manejo Integrado del Picudo del Algodón.

Palabras claves: hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Anthonomus grandis*, virulencia, algodón, control microbiano de plagas.

***Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates virulent for the control of the boll weevil, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae)**

Abstract

The boll weevil, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), is the main pest of cotton in the Americas, present in Argentina since 1993. The aim of this work was to select native isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales), both virulent against *A. grandis*. The native isolates were obtained from soil and insects, and from the Laboratory of Entomopathogenic Fungi collection (IMYZA, INTA). Screening was performed to evaluate the pathogenicity of 28 isolates of *M. anisopliae* and 66 isolates of *B. bassiana* against boll weevil adults. To select the isolates, LC₅₀ values of the most virulent isolates were calculated, and the effects of these isolates on the feeding and reproductive behavior of the adults were evaluated. In addition, different characteristics of the selected isolates were evaluated, which included compatibility between the isolates and insecticides, the combined effect of insecticides and isolates on boll weevil adults, and high temperatures tolerance of the isolates. Finally, massive production parameters were calculated for the selected isolates, and formulations were applied in cotton crops. Isolates Ma 50 and Ma 20 (*M. anisopliae*) were the most virulent against *A. grandis* and their LC₅₀ values were 1.13×10^7 and 1.20×10^7 conidia/ml, respectively. Also, we found a decrease on the feeding behavior caused by infected females treated with Ma 20 and Bb 23 isolates, and the decrease of the eggs laying of females treated with Ma 20 isolate. In addition, these isolates were compatible with pyrethroid insecticides, and showed tolerance to higher temperatures. In summary, these results indicate the possibility of the use of *M. anisopliae* as a microbiological control agent against boll weevils, included in an Integrated Pest Management program.

Key words: entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Anthonomus grandis*, virulence, cotton, pest microbial control.

Agradecimientos

- A mi director de tesis, Dr. Roberto Lecuona, por ayudarme en este largo proceso de aprendizaje y formación profesional.
- A mis compañeros de laboratorio con quienes compartimos el día a día durante estos años, y a todos aquellos que prestaron una ayuda en las distintas etapas de esta tesis.
- A Ing. Agr. María Ana Sosa de EEA Reconquista, por llevar a cabo los ensayos de campo, envío de material y recibirnos amablemente en su lugar de trabajo.
- A Ing. Agr. Rubén La Rossa por facilitarme el programa TABLAVI y su ayuda en el análisis de datos.
- A Lorena La Fuente por ayudarme con la búsqueda de bibliografía e impresión. Por su buena predisposición siempre.
- A Juan amigo y compañero de vida por acompañarme día a día en los buenos momentos y también alentarme en los momentos más difíciles. Por los momentos más lindos a su lado y por la magia de la vida.
- A Lucio por hacerme la persona más feliz, por alegrarme todas las mañanas con su sonrisa picarona.
- A mis papás Nora y Mario, por apoyarme, escucharme y alentarme día a día. Por hacerme la persona que soy hoy. ¡Gracias!
- A mis hermanas Daniela, Carola y Noelia que a pesar de la distancia siempre están presentes y por darme tantos sobrinos hermosos.
- A mis amigas del alma por siempre tener el mejor consejo en el momento apropiado.
- Al INTA por permitir realizar mi formación, darme el espacio y recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Foncyt) por los subsidios PICT 683/2006 que facilitaron el financiamiento para llevar a cabo esta tesis.
- A ANPCyT – FONCYT y al CONICET por haberme otorgado las Becas de posgrado para poder llevar adelante esta Tesis.

¡Gracias!

a la luz de mi vida

Índice	
Resumen	2
Abstract	4
Agradecimientos	6
Capítulo 1: Introducción General.....	11
1.1. Algodón	12
1.1.1. Ciclo biológico del algodón	13
1.1.2. Artrópodos perjudiciales al cultivo de algodón.....	14
1.2. Picudo del Algodonero	16
1.2.1. Origen, dispersión y distribución actual	16
1.2.2. Características e impacto económico de <i>A. grandis</i>	18
1.2.3. Control del picudo del algodón.....	19
1.3. Hongos entomopatógenos.....	25
1.3.1. Proceso patogénico de los hongos entomopatógenos	25
1.3.2. Reacciones de defensas de los invertebrados.....	30
1.3.3. <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo - Crivelli) Vuillemin 1912	31
1.3.4. <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff, 1879) Sorokin	33
1.4. Objetivos e hipótesis	35
Capítulo 2: Materiales y Métodos generales.....	37
2.1. Mantenimiento de hongos entomopatógenos.....	38
2.2. Preparación de suspensiones de conidios, titulación y evaluación de la viabilidad.....	38
2.3. Población de insectos experimentales. Cría masiva del picudo del algodón.....	40
2.4. Bioensayos con adultos de <i>A. grandis</i>	42
Capítulo 3: Parámetros biológicos y poblacionales de <i>A. grandis</i> en cría artificial	43
3.1. Introducción	44
3.2. Materiales y Métodos	46
3.3. Resultados	47
3.4. Discusión	51
Capítulo 4: Selección de hongos entomopatógenos virulentos para el picudo del algodón.....	53
4.1. Introducción	54

4.1.1. Hongos entomopatógenos en el control del picudo del algodónero	54
4.1.2. Aislamiento de cepas nativas de hongos entomopatógenos.....	55
4.1.3. Efectos subletales de los hongos entomopatógenos	56
4.2. Materiales y métodos	58
4.2.1. Aislamiento de cepas nativas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	58
4.2.2. Patogenicidad sobre adultos de <i>A. grandis</i>	59
4.2.3. Virulencia sobre adultos de <i>A. grandis</i>	60
4.2.4. Efectos subletales	61
4.3. Resultados	64
4.3.1. Aislamiento de cepas nativas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	64
4.3.2. Patogenicidad de los aislamientos	65
4.3.3. Concentración letal media de los aislamientos sobre el picudo del algodónero	70
4.3.4. Efecto de la infección fúngica sobre el comportamiento de alimentación	71
4.3.5. Efecto de los hongos entomopatógenos sobre la oviposición.....	73
4.4. Discusión	75
4.4.1. Patogenicidad y virulencia de los aislamientos sobre <i>A. grandis</i>	75
4.4.2. Efecto de los hongos entomopatógenos sobre la alimentación	77
4.4.3. Efecto de los hongos entomopatógenos sobre la oviposición.....	78
Capítulo 5: Características de los aislamientos seleccionados	80
5.1. Introducción	81
5.1.1. Compatibilidad con insecticidas químicos.....	82
5.1.2. Efecto de la temperatura.....	83
5.2. Materiales y métodos	85
5.2.1. Compatibilidad entre las cepas preseleccionadas y los agroquímicos comúnmente utilizados en cultivos de algodón	85
5.2.2. Interacción toxicológica hongo-insecticida sobre adultos de <i>A. grandis</i>	89
5.2.3. Efecto de la temperatura sobre los aislamientos.....	90
5.3. Resultados	94
5.3.1. Compatibilidad de los aislamientos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> con insecticidas	94
5.3.2. Bioensayos hongo – insecticida.....	99

5.3.3. Efecto de la temperatura.....	104
5.4. Discusión	111
5.4.1. Efecto de los insecticidas químicos sobre los aislamientos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> virulentos para el picudo del algodónero	111
5.4.2. Efecto de la temperatura sobre los aislamientos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	115
Capítulo 6: Producción masiva, formulación y ensayos en campo	119
6.1. Introducción	120
6.2. Materiales y métodos	124
6.2.1. Descripción del proceso de producción	124
6.2.2. Producción. Ensayos preliminares y puesta a punto.....	129
6.2.3. Dinámica de producción de los aislamientos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> seleccionados.....	129
6.2.4. Desarrollo de formulaciones experimentales del micoinsecticida y evaluación en parcelas a campo	131
6.2.5. Ensayos preliminares en condiciones de semicampo	132
6.3. Resultados	134
6.3.1. Ensayos preliminares de producción del aislamiento Ma 20.....	134
6.3.2. Dinámica de producción de los aislamientos seleccionados contra el picudo	136
6.3.3. Bioensayos con los aislamientos producidos	141
6.3.4. Formulaciones experimentales	142
6.3.5. Evaluación de las formulaciones en el campo.....	143
6.4. Discusión	145
6.4.1. Producción.....	145
6.4.2. Formulación.....	148
6.4.3. Evaluación a campo	149
Conclusiones generales.....	151
Bibliografía	155
Anexos.....	173

Capítulo 1

Introducción General

1.1. Algodón

El algodón es un cultivo de áreas tropicales y subtropicales, constituyendo el producto agrícola no alimentario de mayor intercambio comercial en el ámbito mundial. En la República Argentina, el algodón es un cultivo regional. La mayor área está ubicada en la región noreste (NEA) de nuestro país, siendo Chaco la mayor provincia productora, seguida por Santiago del Estero, Santa Fe, Formosa y, en menores superficies de siembra, Corrientes, Salta, San Luis, Catamarca, Córdoba y Entre Ríos. La superficie en la campaña 2012/13 fue de 404.720 ha, correspondiendo a Chaco el 36% , Santa Fe 29% , Santiago del Estero 27% y Formosa 6% y el resto a las otras provincias (ICAC 2010; SAGPyA, 2013).

El algodón tiene una importancia relevante, tanto en los aspectos económicos como sociales. Los productores que lo cultivan en Argentina son, en su mayoría, pequeños y medianos, con una fuerte participación de la agricultura familiar. Este cultivo involucra el proceso productivo tanto como la manufactura del algodón en la industria textil. En el sector de la producción primaria el producto principal del sector es la fibra y, secundariamente, la semilla. La fibra de algodón tiene como destino el consumo interno (hilanderías de algodón) y la exportación (países de Asia, Europa y América, especialmente Brasil) a través de distintos agentes de comercialización. La semilla de algodón se canaliza hacia tres usos principales: aceitería, forraje para ganado vacuno y semilla para la siembra. El sector de la industria textil comprende los procesos básicos de hilandería y tejeduría, en algunos casos integrados con los de tintorería y confección. Se registran más de 466 mil puestos de trabajo directos en esta actividad (Elena et al., 2000; ICAC, 2010).

A nivel mundial, el algodón es uno de los más importantes y ampliamente producidos cultivos agrícolas, sembrándose en más de 80 países (aproximadamente el 2% del suelo cultivable del mundo), haciendo de éste uno de los más significativos en el uso del suelo luego de los granos (ICAC, 2011). Más de 100 millones de familias se dedican directamente a la producción de algodón, y si se considera mano de obra, transporte, embalaje desmontado,

almacenamiento y otras actividades relacionadas, se alcanza entre 250 y 300 millones de personas trabajando en el mismo. El algodón también ofrece empleo a millones de personas en las industrias conexas como los insumos agrícolas, maquinaria y equipos, trituración de semilla y fabricación de textiles. El cultivo de algodón contribuye a la seguridad alimentaria en las zonas rurales de los países en desarrollo de África, Asia y América Latina (ICAC, 2011).

1.1.1. Ciclo biológico del algodón

La planta de algodón que se cultiva en América del Sur pertenece a la especie *Gossypium hirsutum* L. (1763) (familia Malvaceae). Es un arbusto anual, de hasta 1,5 - 2,0 m de alto, tallos generalmente ramificados, con ramas vegetativas y reproductivas. El período vegetativo o ciclo del algodnero dura aproximadamente 180 días (en el cultivo convencional) y pasa por tres etapas bien diferenciadas (Figura 1.1):

1. Etapa de siembra hasta el inicio del pimpollado (0 - 40 días desde la emergencia (DDE)). Se presentan los procesos de germinación, de tres a cuatro días y el crecimiento inicial o fase de plántula de 12 a 20 días.
2. Etapa desde inicio de pimpollado hasta el fin de la floración efectiva (30 - 100 DDE). Incluye los procesos secuenciales de prefloración y floración. Esta es una etapa crítica para el cultivo ya que humedad, ventilación y calor juegan su papel habitual, en conjunto con la fertilidad del suelo, sobre la fructificación (de 40 a 50 días entre la fecundación y la apertura de la cápsula).
3. Etapa desde fin de floración efectiva a final del ciclo (100 - 150 DDE). Después de la maduración del fruto se produce la dehiscencia, abriéndose la cápsula con aparición del algodón en forma de copos retenidos dentro de los carpelos. La floración del algodnero es escalonada, por lo que la recolección es también escalonada.

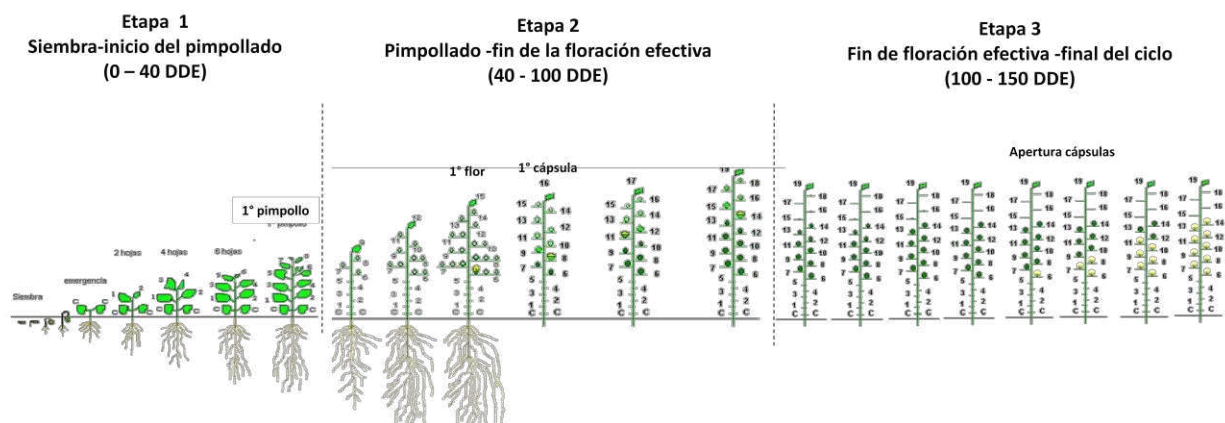


Figura 1.1. Etapas del cultivo de algodón

1.1.2. Artrópodos perjudiciales al cultivo de algodón

El agroecosistema algodonero presenta problemas para el control de artrópodos plagas (insectos y ácaros), debido a un abanico de situaciones: inadecuada aplicación de productos químicos con incremento en los costos del cultivo, surgimiento de resistencia en las plagas principales, sistema de producción variable según diferentes regiones geográficas, entre otras. A estos inconvenientes, se le debe sumar la presencia del picudo del algodonero, *Anthonomus grandis* Boheman (1843) (Coleoptera: Curculionidae), considerado una de las plagas más importantes del algodón en América.

Existe una gran variedad de artrópodos asociados al cultivo de algodón, los cuales producen daños en los mismos, ya sea por defoliación y consecuente disminución de la actividad fotosintética, como por pérdida directa de los pimpollos de algodón (Tabla 1.1). Además, estas plagas se las puede encontrar en distintas etapas del cultivo de algodón (Figura 1.2).

Tabla 1.1. Insectos y ácaros perjudiciales para el cultivo del algodón en la Argentina y el daño que producen.

Artrópodo	Especie	Nombre común	Daño
Insecta			
Lepidoptera	<i>Alabama argillacea</i>	Oruga de la hoja	Hojas
	<i>Heliothis virescens</i>	Oruga capullera	Pimpollos
	<i>Helicoverpa gelotopoeon</i>	Oruga capullera	Pimpollos
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Oruga militar	Hojas y estructuras reproductivas
	<i>Pectinophora gossypiella</i>	Lagarta rosada	Pimpollos
Thysanoptera	<i>Frankliniella paucispinosa</i>	Thrips	Hojas y brotes
	<i>Caliothrips brasiliensis</i>	Thrips	Hojas y brotes
Homoptera	<i>Aphis gossypii</i>	Pulgón del algodón	Hojas y brotes
	<i>Bemisia tabaci</i>	Mosca blanca	Hojas y brotes
Heteroptera	<i>Horcias nobilellus</i>	Chinche Horcias	Estructuras reproductivas
	<i>Dysdercus rufficollis</i>	Chinche tintórea	Semillas
	<i>Nezara viridula</i>	Chinche verde	Estructuras reproductivas
	<i>Gargaphia torresi</i>	Mosquilla	Hojas
Coleoptera	<i>Anthonomus grandis</i> B.	Picudo del algodouero	Estructuras reproductivas
Acari	<i>Tetranychus telarius</i> Koch	Arañuela roja	Hojas

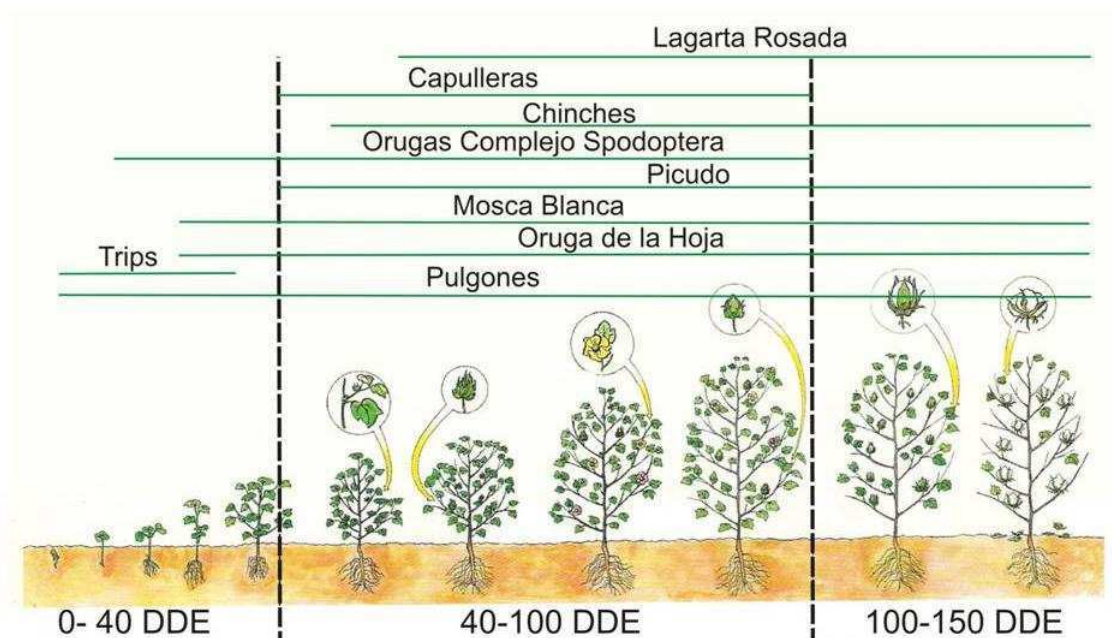


Figura 1.2. Plagas principales que afectan al algodón convencional según el período de incidencia (DDE: días desde la emergencia) (Tomado de EEA Sáenz Peña, INTA)

1.2. Picudo del Algodonero

1.2.1. Origen, dispersión y distribución actual

El picudo del algodón es considerado una de las más importantes plagas que afectan los cultivos de algodón en América (Kim et al., 2008). El picudo fue encontrado por primera vez en 1880 en México. Según la hipótesis de Burke et al. (1986), el picudo se habría originado en México y la presencia del mismo en EEUU se explicaría por una dispersión natural hacia el norte. Si bien este insecto ataca principalmente cultivos de algodón, se sabe que puede utilizar otras especies, preferentemente Malváceas de los géneros *Gossypium*, *Cienfuegosia*, *Hampea*, *Hibiscus* y *Thespesia*, como hospederos alternativos y para su alimentación, obteniendo energía necesaria para su supervivencia en ausencia de algodón (Cuadrado, 2002). Estas plantas

alternativas estarían asociadas a la dispersión y habrían precedido al inicio del cultivo del algodón por el hombre. La dispersión habría sido acompañada por la diferenciación de algunos de sus huéspedes nativos de los géneros *Gossypium* y *Cienfuegosia*, favoreciendo, por selección natural, la adaptación de las poblaciones de picudo a nuevas condiciones ambientales, con poblaciones capaces de colonizar el cultivo extensivo del algodón en el cinturón del sudeste de EEUU (ambientes más áridos y secos que los de su área de distribución original) (Lanteri et al., 2003). Una vez en EEUU, *A. grandis* se dispersó rápidamente por todo el cordón algodonero entre 1889 y 1916. La dispersión hacia América del Sur es posterior y asociada al cultivo de algodón (Lanteri et al., 1997). La presencia de *A. grandis* en distintos países de América del Sur ha sido considerada como resultado de introducciones sucesivas a causa del comercio del algodón. En América del Sur, el picudo fue observado por primera vez en Venezuela (1949) y Colombia (1951) en cultivos de algodón (Cross et al., 1975). En Brasil fue encontrado recién en 1983 en el estado de Sao Paulo (Martins et al., 2006). Desde su introducción en Brasil en 1983 el picudo se ha dispersado en dirección sudoeste hacia Paraguay (1991), Argentina (1993) y Bolivia (1997) (Scataglini et al., 2006; Stadler y Buteler, 2007).

En Argentina, el picudo del algodonero fue encontrado por primera vez en el Parque Nacional Iguazú (Pcia. Misiones) en 1993, en una zona donde no se cultiva algodón y unos años después fue encontrado en zonas algodoneras de Chaco, Corrientes y Formosa. Actualmente se encuentra establecido en las principales provincias de cultivo algodonero, entre ellas Chaco, Formosa, Santa Fe y Santiago del Estero. Estudios genéticos sostienen la hipótesis tradicional que propone que la plaga fue introducida de EEUU hacia América del Sur como resultado del comercio de algodón. Sin embargo se ha encontrado una población en el Parque Nacional Iguazú (área no cultivada) que posee una elevada variabilidad y diversidad haplotípica, considerados ancestrales, y asociados con áreas de vegetación nativa de la selva misionera, sugiriendo que se trata de un linaje ancestral de picudo (Lanteri et al., 2003; Scataglini et al., 2000; Scataglini et al., 2006).

Respecto a la taxonomía del picudo, las distintas especies se separan por características externas del adulto y esto coincide con la distribución geográfica, encontrándose tres grupos (Cross, 1973):

- 1) *A. g. grandis* o forma del sudeste de EEUU (especie asociada al cultivo de algodón).
- 2) *A. g. thurberiae*, encontrado en Arizona y noroeste de México.
- 3) Formas intermedias encontradas en México, América Central y Cuba.

1.2.2. Características e impacto económico de *A. grandis*

La dificultad para el control de *A. grandis* está relacionada con características comportamentales y biológicas que hacen de esta especie una plaga clave para el cultivo de algodón. El daño en el algodón es producido por los adultos (hembras y machos) que se alimentan de los pimpollos y cápsulas disminuyendo la calidad de la fibra, y por las larvas que se desarrollan dentro de los pimpollos florales y de las cápsulas produciendo la abscisión de estas estructuras reproductivas.

Algunas características son (Lanteri et al., 2003):

- La especie registra una elevada tasa y eficiencia reproductiva.
- La supervivencia de los estados de huevo y larva es muy elevada puesto que el desarrollo larval es endofítico, quedando menos expuesto a posibles depredadores o disecación.
- Puede haber entre siete y diez generaciones anuales, y el período que media entre la oviposición y la emergencia de los adultos es muy breve en condiciones óptimas de temperatura y humedad.
- Se adapta a diferentes ambientes, además puede atravesar una diapausa invernal, período en que sobreviven en los pimpollos caídos, la hojarasca y otros lugares de refugio, sin desarrollar actividad reproductiva y con un consumo energético mínimo.
- La capacidad de dispersión de la especie es muy grande debido a que los adultos son buenos voladores, además del transporte de huevos, larvas y pupas dentro de los

pimpollos y botones florales de diversas malváceas, por medio del viento, adheridos a diversos animales y en el caso del algodón, mediante instrumentos de labranza, acopio y transporte.

- Los machos producen una feromona de agregación que atrae tanto a hembras como a machos hacia las fuentes de alimento.
- El picudo es una especie oligófaga al estado de larva, que se alimenta no sólo de *G. hirsutum*, sino también de otras especies de malváceas de las tribus Gossypieae, Hibisceae y probablemente de otros huéspedes aún no bien estudiados.

El picudo del algodonerero primero atacó el algodón argentino en el noreste de Formosa, donde estuvo contenido durante algunos años mediante manejo enfocado en impedir la dispersión de esta plaga al resto de las provincias productoras de algodón. En el año 2002, fue hallado en Chaco, primero en el Este, luego el Centro y Sudeste de la provincia, lo cual perjudicó mucho, en particular a los pequeños productores. Luego de unos años el picudo ingresó en las provincias de Santiago del Estero y Santa Fe. En el sudoeste chaqueño en la campaña 2010/11 se registraron mermas de rendimiento de algodón en bruto del 47%, siendo estas pérdidas producto de la abscisión de botones florales producidas por el picudo del algodonerero (Casuso et al., 2011). Durante el 2011, algunas estimaciones de las pérdidas debidas al picudo están cercanas a los 100 millones de dólares. Además de las pérdidas de rendimiento, se le suma el costo de insecticidas, trampas, feromonas, sin tomar en cuenta una cantidad de agricultores que abandonaron la siembra frente al temor de esta plaga y la posible pérdida de las cosechas.

1.2.3. Control del picudo del algodonerero

Inicialmente, el control del picudo del algodonerero se basó en la aplicación de insecticidas químicos. Sin embargo, el extensivo uso de insecticidas no sólo causa un serio problema en la contaminación ambiental, sino una drástica reducción de agentes naturales de control biológico que podrían tener otras plagas agrícolas. El efecto adverso sobre los enemigos naturales a

menudo conduce a un posterior aumento de las poblaciones de plagas secundarias como el gusano cogollero. Esto, a su vez, puede resultar en pérdidas de cosechas y al aumento del uso intensivo de plaguicidas para proteger la cosecha de algodón (Haney et al., 2009). Además, otra de las desventajas del uso de insecticidas químicos son su alto costo y la aparición de resistencia en la población de la plaga. La resistencia genética del picudo a los insecticidas es el mayor impedimento para el control químico a largo plazo de esa plaga. Se ha confirmado en los EEUU, México y América Central resistencia a los hidrocarburos clorados, organofosforados y piretroides (Stadler, 2009).

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es una estrategia comprendida dentro de la visión sustentable de la agricultura, y entre las tácticas que involucra para el control de insectos se cuentan el control químico, las prácticas culturales, las modificaciones del comportamiento de la plaga, los cultivares resistentes, y el control biológico. El MIP tuvo su origen en el concepto de Control Integrado que fue propuesto por primera vez por Stern et al. (1959). Según estos autores, tres puntos clave convierten al insecto en plaga: 1) cambios en el ambiente producidos por el humano que favorecen a la plaga, 2) nuevas especies invasivas en agroecosistemas y, 3) cultivos con baja tolerancia a los daños ocasionados por la plaga. Estos problemas llevaron al uso de insecticidas en los cultivos, produciendo efectos secundarios como: el desarrollo de resistencia en la plaga, aparición de focos secundarios, resurgimiento de la plaga, problemas en la seguridad humana y residuos del insecticida en los productos. Por lo tanto proponen la integración del control biológico con el control químico teniendo en cuenta los siguientes puntos: 1) Reconocimiento del ecosistema, 2) aumento de enemigos naturales, 3) muestreo de la población y predicción, incluyendo umbrales económicos para disparar mecanismos, 4) controles selectivos, para minimizar el efecto residual en los enemigos naturales (Stern et al., 1959; Goodell, 2009).

En particular, el manejo de *A. grandis* se basa en distintos métodos químicos, biológicos y culturales, sustentados en un plan de monitoreo para detectar si la población de la plaga se encuentra presente y en qué densidad para poder actuar apropiadamente.

- **Monitoreo de la plaga**

El uso de las trampas de feromonas para el monitoreo de la población de *A. grandis* en el cultivo es uno de los métodos más eficaces. El macho de picudo produce una feromona que actúa tanto como señal sexual como de agregación según la etapa fenológica del algodón (Hardee et al., 1970; Dickens, 1984). Tumlinson et al. (1969) identificaron los componentes de la feromona producida por machos del picudo, la cual está formada por una mezcla de cuatro compuestos, denominada *Grandlure*. Esta feromona fue sintetizada y estudiada en EEUU, donde se desarrolló una formulación de liberación lenta (Hardee y Mitchell, 1997) que fue utilizada en trampas con el objetivo de detectar la plaga en forma temprana y poder realizar un control adecuado (Dickerson y Haney, 2001; Miranda y Silva, 2004).

- **Control químico**

A pesar de los problemas que se presentan al utilizar este método, el control químico aún constituye una herramienta eficaz para disminuir las poblaciones de picudo, siempre y cuando sea utilizado oportuna y racionalmente. Para ello es necesario determinar y recomendar el uso de los mismos, dependiendo de la densidad de la población y la etapa en la que se encuentra el cultivo. Se pueden usar tres tipos de aplicaciones de insecticidas durante la estación para reducir poblaciones de picudo. Los primeros dos tipos corresponden a aplicaciones tempranas o aplicaciones durante la temporada con el objetivo de reducir la población de la plaga durante el crecimiento del algodón. El tercer tipo corresponde a aplicaciones posteriores a la cosecha para reducir las poblaciones de picudo que están entrando en hibernación y se convertirán en nuevos focos infectivos al siguiente año.

- **Control cultural**

Respecto al control cultural, las estrategias sobre las que se basa la propuesta de manejo del cultivo en relación al picudo son concentrar la siembra en el período considerado más adecuado para la misma, realizar el cultivo reduciendo al máximo el período de fructificación sin afectar el rendimiento, controlar el crecimiento y evitar rebrotes luego de finalizada la floración, acelerar el proceso de defoliado y apertura de las cápsulas realizando la cosecha cuando se completen los mismos y destruir los rastrojos apenas finalizada la cosecha (Miranda y Silva, 2004).

Los aspectos básicos del manejo del cultivo de algodón que contribuyen a reducir los efectos perjudiciales de la plaga son:

- Fecha de siembra: Respetar los calendarios establecidos por el SENASA para cada área de manera de optimizar el aprovechamiento de los recursos del ambiente y evitar el suministro continuo y prolongado de alimento al picudo, con siembras escalonadas y durante un largo período.
- La implantación del cultivo deberá realizarse bajo condiciones que permitan un establecimiento rápido y vigoroso para lo cual es importante considerar la calidad y valor cultural de las semillas, las condiciones del lote y la tecnología de siembra a emplear.
- La siembra en surcos estrechos es una herramienta que suma a la lucha contra la plaga. Este sistema implica conceptualmente, alta densidad y acortamiento del ciclo del cultivo lo cual reduce el período de exposición a la plaga durante la fructificación.
- La destrucción completa de los rastrojos es la práctica cultural fundamental e imprescindible. Debe realizarse lo más rápidamente posible después de la cosecha y tiene una estrecha relación con el número de picudos que sobreviven al invierno. Por la alta especificidad del insecto con el algodón como hospedero para la reproducción; una destrucción efectiva de los restos del cultivo en un área grande aumentará el período en

que el insecto estará privado del hospedero y ejercerá impacto reduciendo las poblaciones de picudos que entran en diapausa y de aquellos que sobreviven en el período entre zafras.

La ejecución de estas prácticas culturales en tiempo y forma posibilita la reducción de la población que inicia las infestaciones y por ende reduce el número de tratamientos al inicio del cultivo, favoreciendo a los insectos predadores.

- **Control biológico**

El control biológico puede definirse como: "El uso de organismos vivos para reducir la densidad poblacional o el impacto de un organismo plaga específico, haciendo a esta menos abundante o menos perjudicial de lo que sería de otra manera" (Eilenberg et al., 2001). La definición de DeBach (1974) frecuentemente citada, incluye los términos agentes de control biológico (que se refiere como enemigos naturales) y la regulación de la población. Esto es relevante para el control biológico de los insectos y ácaros plagas cuando se utilizan depredadores y parasitoides. Sin embargo, la dinámica a nivel poblacional producida por los agentes de control biológico microbianos no ha sido bien estudiada y, en muchos casos, no se espera la regulación sostenida de la población de la plaga después de la liberación (o aplicación) de los microorganismos.

Los principales tipos de control biológico utilizados son: 1) control biológico de invertebrados plagas con predadores, parasitoides y patógenos, 2) control biológico de malezas utilizando herbívoros y patógenos, y 3) control biológico de fitopatógenos utilizando microorganismos e induciendo resistencia en las plantas (Eilenberg et al., 2001).

El control biológico de plagas incluye cuatro estrategias diferentes:

- 1) Control biológico clásico: La introducción intencional de un agente de control biológico exótico, generalmente co-evolucionado, para su establecimiento permanente en el ambiente y control de la plaga a largo plazo.
- 2) Control biológico inoculativo: Liberación intencional de un organismo vivo como agente de control biológico, con el objetivo de que éste se multiplique y controle la plaga en un período extenso de tiempo, pero no permanente.
- 3) Control biológico inundativo: El uso de organismos vivos para el control de plagas cuando este es logrado exclusivamente por la liberación de los organismos beneficiosos.
- 4) Control biológico conservativo: Modificación del ambiente o de prácticas existentes para proteger y aumentar los enemigos naturales específicos u otros organismos, para reducir los efectos de las plagas.

Si bien existen muchos depredadores y parasitoides endémicos del picudo, incluidos *Solenopsis invicta*, *Bracon mellitor*, *Bracon compressitarsus* y *Catolaccus grandis*, hasta el momento no se ha logrado desarrollar programas de control biológico aplicado eficiente que reduzcan los niveles de población por debajo de un daño económico. No obstante, *C. grandis* se destaca entre los parasitoides por su especificidad sobre la plaga y por sus características intrínsecas que lo hacen un promisorio agente de control, mediante la cría masiva y liberación en campo (Morales-Ramos et al. 1995a y b; Ramalho et al., 2000, 2007).

El control microbiano es una rama del control biológico y se refiere al uso de microorganismos como agentes de control, tales como bacterias, hongos, virus, protozoos y nematodos entomopatógenos (Eilenberg et al., 2001; Lord, 2005). Los hongos entomopatógenos son importantes componentes del control de varios insectos plaga de agricultura y vectores de enfermedades. En particular, el uso de estos agentes de control biológico en forma de bioinsecticidas son posibles métodos alternativos para el control del picudo (Monnerat et al., 2002).

1.3. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos distribuidos en todo el mundo, existiendo aproximadamente 750 especies de hongos conocidos como patógenos de insectos (Hajek y St. Leger, 1994; Roy et al., 2006). Estos hongos pueden encontrarse en distintas ubicaciones geográficas y climáticas, tanto en suelos cultivados como naturales (Vega et al., 2008). Ellos tienen la particularidad de parasitar a diferentes tipos de artrópodos (insectos y ácaros) y producir la muerte del hospedador (Humber, 2009).

La mayoría de estos hongos son de las divisiones Entomophthorales (Entomophthoromycota) ó anamórficos de Ascomycota (hongos filamentosos facultativos que se reproducen asexualmente por conidios). Aunque estos dos grupos se diferencian en algunos aspectos de la historia de vida, ambos producen conidios u otras esporas asexuales que son las unidades infectivas (Furlong y Pell, 2005; Roy et al., 2006). Además, todos los hongos entomopatógenos poseen un ciclo de vida sincronizado con los estados del hospedador y las condiciones ambientales (Shah y Pell, 2003).

1.3.1. Proceso patogénico de los hongos entomopatógenos

El desarrollo de la patogénesis (micosis) en el insecto se inicia cuando el conidio entra en contacto con su hospedador. En el caso de los Entomophthorales, la unidad infectiva son los conidios primarios dispersados directamente desde un hospedador infectado o los conidios secundarios que son activamente descargados a partir de otro primario (o secundario), o conidios pasivamente dispersados a partir de un conidióforo secundario formado a partir de conidios primarios o secundarios. En el caso de los hifomicetes o ascomicetes anamórficos, las unidades infectivas son los conidios que se dispersan en forma pasiva (Boucias y Pendland, 1998).

A diferencia de otros microorganismos patógenos de invertebrados, tales como bacterias, virus y microsporidios, la infección de hospedadores sanos involucra la penetración de un tubo germinativo del hongo a través del exoesqueleto, sin necesidad de la ingestión del mismo (Boucias y Pendland, 1991; Castrillo et al., 2005). El exoesqueleto de los artrópodos es una estructura compleja que consta de varias capas las cuales proporcionan una serie de desafíos para el ingreso de un potencial patógeno. El exoesqueleto está compuesto por dos capas segregadas por la epidermis, la epicutícula y la procutícula. La primera está formada por proteínas y ceras que evitan la pérdida de agua. La segunda, mucho más gruesa, se puede dividir en exocutícula y endocutícula, ambas formadas por fibrillas de quitina distribuidas en distintas orientaciones, dentro de una matriz proteica. La procutícula provee la mayor barrera mecánica. Una vez en contacto con la epicutícula, la unidad infectiva del hongo puede reaccionar con el ambiente químico de la misma. Según como sea esta interacción, el conidio puede germinar produciendo un tubo germinativo u otro tipo de espora secundaria que dispersa a un nuevo sustrato. La presencia o ausencia de ácidos oleicos de la epicutícula puede estimular o inhibir el desarrollo de los hongos entomopatógenos y estos pueden actuar como un factor determinante de la especificidad del patógeno (Roberts y Humber, 1981; Humber, 2009).

Las esporas producen un tubo germinativo sobre la cutícula del hospedador que puede inmediatamente comenzar a crecer dentro de la cutícula del potencial hospedador, o puede crecer sobre la superficie hasta alcanzar algún sitio químicamente apropiado, por ejemplo zonas más débiles de la cutícula o aberturas naturales en el cuerpo del hospedador como la boca, ano o espiráculos. Generalmente, ocurre la formación de un apresorio o haustorio bien diferenciado que fija al conidio firmemente a la cutícula ayudando en la penetración (Zacharuk, 1973). Además, muchos hongos patógenos secretan una serie de lipasas, proteasas y quitinasas, que permiten el paso del hongo a través de la cutícula en combinación con una presión mecánica ejercida por las hifas (Roberts, 1980). El paso a través de la epidermis da por un proceso mecánico. Durante los pasos iniciales de germinación y penetración de la cutícula, el hongo permanece en un modo de crecimiento germinativo, utilizando los nutrientes

que se encuentran en la espora (en forma de glucógeno y aceites) como fuente de materiales esenciales para producir la pared celular del tubo germinativo y proveer la energía requerida en este proceso, obteniendo del ambiente externo solamente oxígeno y agua. Cuando el hongo llega al hemocele, ocurre la transición del crecimiento germinativo al crecimiento vegetativo. El hongo pasa a utilizar principalmente fuentes externas de nutrientes y compuestos estructurales. El cambio metabólico de germinativo a vegetativo tiene profundas implicancias en la biología del hongo permitiendo al mismo crecer en forma indeterminada. Excepto algunas especies de hongos que precisan condiciones especiales para producir esta transición, muchas especies son fáciles de hacer crecer en condiciones de cultivos, por ejemplo los hongos pertenecientes a los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* (Humber, 2009).

Una vez en el hemocele, el hongo puede continuar creciendo como hifas, o se fragmenta en pequeños segmentos llamados “cuerpos hifales” que proliferan por fragmentación o gemación. Los cuerpos hifales circulan por el cuerpo del insecto, incrementando la superficie que ocupan del hospedador (y por lo tanto la capacidad de absorber nutrientes) más rápidamente que el crecimiento micelial. El crecimiento en forma levaduriforme permite en muchos casos evadir la respuesta inmune que se produce en el hospedador debido a características particulares de la pared celular. Una vez que el hongo ha producido una biomasa sustancial, el sistema inmune del hospedador es rápidamente saturado e incapaz de frenar el desarrollo fúngico (Roberts y Humber, 1981).

En resumen, el inicio de la infección se da cuando el conidio del hongo se adhiere a la cutícula del hospedador y forma un tubo germinativo que penetra directamente o puede formar un haustorio de donde sale una hifa que atraviesa la cutícula y la epidermis. Una vez en el hemocele, el crecimiento vegetativo puede estar dado como hifas o, más típicamente, como cuerpos hifales que proliferan por gemación rápidamente y circulan a través del hemocele evadiendo el sistema inmune del insecto (Figura 1.3).

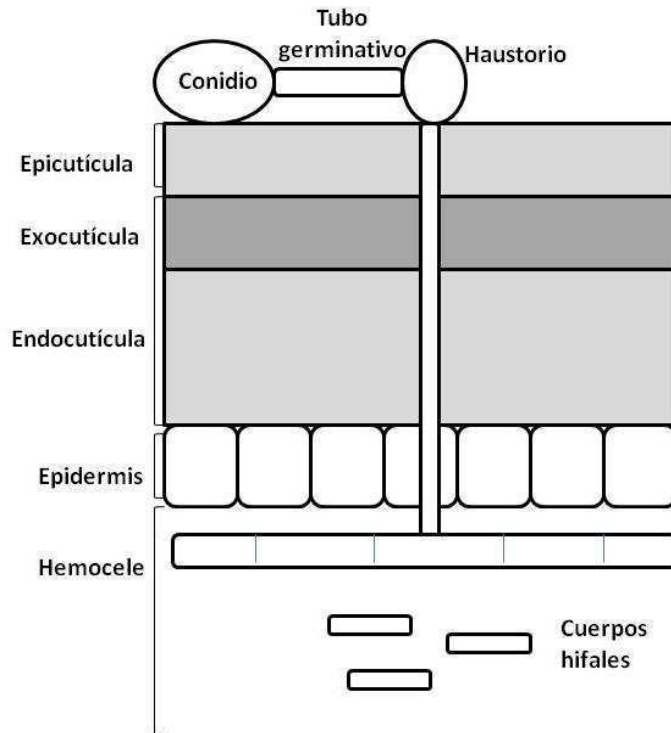


Figura 1.3. Diagrama del proceso de infección fúngica de un hongo entomopatógeno típico.

Las infecciones fúngicas tienden a desarrollarse en el hemocele y no ataca inmediatamente los tejidos de los hospedadores. Algunos hospedadores pequeños mueren en un día o menos, pero la mayoría de las infecciones fúngicas requieren dos o varios días para causar la muerte. El desarrollo fúngico dentro del hemocele, permite al hongo crecer dentro del hospedador vivo, el cual continúa alimentándose, respirando y excretando. Cuando el hongo crece comienza a absorber una gran cantidad de nutrientes del hospedador incrementando la competencia por el oxígeno disponible e impidiendo la circulación de la sangre por el hospedador afectado (Gillespie y Claydon, 1989). A medida que aumenta la competencia por los recursos el sistema de órganos del hospedador comienza a fallar, produciendo la muerte del hospedador y el inicio de la fase reproductiva del hongo. En este momento el hongo comienza a secretar grandes cantidades de enzimas degradativas que atacan los músculos, sistema nervioso, túbulos de Malpighi (sistema excretor) y otros órganos del hospedador. Además de la destrucción de los tejidos y pérdida de las funciones excretoras y respiratorias, se produce un

gran cambio en el ambiente interno que contribuye fuertemente a la muerte del hospedador e inicio de la esporulación del hongo.

Los hongos hipocreales producen un amplio rango de toxinas que incluyen ciclopéptidos (dextruxinas, beauvericinas, bassianolida, oosporinas, ciclosporinas, etc.), efrapeptinas, policétidos, y un amplio rango de otros compuestos con diversas actividades biológicas (Roberts y Humber, 1981). No todos los hongos ni todas las cepas de una especie fúngica producen toxinas en el hemocele de los artrópodos. Las toxinas producidas pueden originar la muerte del artrópodo debido a sus propiedades insecticidas o actuar como inhibidoras de las reacciones de defensa del hospedante por alteraciones de los hemocitos y retardo en la agregación de las células de la hemolinfa (Vey y Gotz, 1986). Si bien muchos trabajos sugieren que tales toxinas se encuentran involucradas en el proceso infectivo y muerte del hospedador, aún hoy se discute sobre el rol de las micotoxinas en la virulencia de hongos entomopatógenos sobre diversos artrópodos. Las toxinas y otros metabolitos secundarios producidos por los hongos entomopatógenos podrían tener como función principal aportar protección antibiótica contra otros hongos y bacterias de crecimiento más rápido que el hongo entomopatógeno (Humber, 2009).

La producción de conidios u otros propágulos asexuales ocurre por lo general rápidamente luego de producirse la muerte del hospedador. En algunos hongos hipocreales, el hongo en el cadáver no produce conidióforos externos, sino que forma un esclerocio en todo el cadáver, y luego da lugar a un estroma sexual externo con peritecio, ascos y ascosporas (especies del género *Cordyceps*) (Roberts y Humber, 1981).

La salida del hongo a partir salir del cadáver del insecto está dado por reacciones enzimáticas y mecánicas. Generalmente ocurre primero por las partes más débiles de la cutícula del hospedador (membranas intersegmentales, zonas de inserción de las patas, ojos, mandíbula, etc.). Una vez fuera del hospedador se producen las esporas capaces de infectar otro hospedador. La morfología de estas estructuras varía según los 100 géneros de hongos

entomopatógenos. Los conidios de los Entomophthorales son formados sobre el cuerpo del hospedador y activamente descargados de las células. Los conidios de hongos hipocreales anamórficos, a pesar que muestran una gran variación morfológica en sus conidios y en la conidiogénesis, siempre son dispersados en forma pasiva por el viento, agua y la transmisión del hongo a través de hospedadores infectados (Roberts y Humber, 1981; Castrillo et al., 2005).

1.3.2. Reacciones de defensas de los invertebrados

Los hospedadores invertebrados tienen un sistema inmune capaz de emplear distintos tipos de defensas contra posibles agentes infecciosos. Los compuestos constitutivos presentes en la cutícula pueden ser tóxicos o inhibitorios para el desarrollo de algunos hongos y pueden ayudar a determinar si el hongo es capaz o no de penetrar o infectar un hospedador específico. La melanización u otras de las reacciones inmunes no celulares dentro de la cutícula podrían aportar nuevos compuestos que actúan contra el organismo invasor. Cuando el hongo penetra a través de las capas de la procutícula, las reacciones de melanización cuticular no celulares pueden frenar o retardar el progreso del hongo a través de la cutícula, ya sea por la toxicidad o por la barrera física que se presenta (ya que pocos hongos producen enzimas capaces de degradar melanina). Una vez que ingresó al hemocele, la mayoría de los insectos son capaces de atacar un organismo extraño con un conjunto de respuestas inmunes celulares producida por varias clases de hemocitos circulantes en el hemocele, tales como la fagocitosis de pequeñas partículas (por ejemplo bacterias), o las reacciones de encapsulación de grandes partículas. En otros casos, ocurren reacciones inmunes no celulares (humorales) como la deposición de gruesas capas de melanina sobre la superficie del invasor (Hajek y St. Leger, 1994; Humber, 2009).

Asimismo, el hongo puede invadir y destruir otros tejidos, o producir sustancias tóxicas (metabolitos secundarios) que interfieran no sólo con el normal desarrollo y metamorfosis del hospedador, sino que en algunos casos con los mecanismos de defensa inmune necesarios para

contrarrestar el ataque de otros microorganismos (Castrillo et al., 2005, Roy et al., 2006, Vega et al., 2008, Wright y Chandler, 1991).

La mayoría de los hongos entomopatógenos poseen ciclos de vida sincronizados con el estadio de su hospedador y con las condiciones ambientales. Las especies, y a veces aislamientos dentro de una especie, pueden comportarse muy diferente. Por ejemplo, el rango de hospedadores, los niveles de infección, tasas de germinación y temperatura óptima pueden variar entre especies y aislamientos (Shah y Pell, 2003; Furlong y Pell, 2005). El rango de hospedadores es determinado por especificidad, definida como adaptaciones recíprocas y afinidades entre un organismo patogénico y todas las especies hospedadoras. Los factores que determinan si una infección resulta exitosa están determinados por la especificidad en la unión del conidio, la germinación y la evasión de las defensas del hospedador (Castrillo et al., 2005).

Los hongos anamórficos *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) y *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) son utilizados en control de plagas. Estos hongos son enemigos naturales de un gran número de insectos y arácnidos y ambos poseen distribución cosmopolita (Hajek y St. Leger, 1994). Muchos insectos de la familia Curculionidae son susceptibles a la infección por ambas especies (Alston et al. 2005).

1.3.3. *Beauveria bassiana* (Balsamo - Crivelli) Vuillemin 1912

B. bassiana es un hongo que pertenece al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Cordycipitaceae. Este hongo ha sido encontrado atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de importancia agrícola (Alves, 1986). *Beauveria* es un género de hongos anamórficos cosmopolitas, habitantes del suelo, necrótrofos, patógenos facultativos de artrópodos (Roberts and Hajek, 1992; Goettel et al., 2005) que se los puede encontrar también como saprótrofos y como endófitos en plantas (Vega et al., 2008). El género *Beauveria* es caracterizado morfológicamente por células conidiógenas globosas con forma de botella formadas por una única célula, conidios terminales

holoblásticos son producidos en una sucesión simpodial sobre un raquis denticulado indeterminado (Figura 1.4b y c). Las especies de *Beauveria* son distinguidas principalmente de acuerdo con las características de los conidios, que son típicamente hialinos, pared lisa, 1,5-5,5 μm y globosos a cilíndricos o vermiformes (Boucias y Pendland, 1998; Rehner et al., 2011). Este hongo presenta una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo de los artrópodos muertos, tanto como sobre medios de cultivo axénico, la cual está formada por el micelio y conidios (Figura 1.4a).

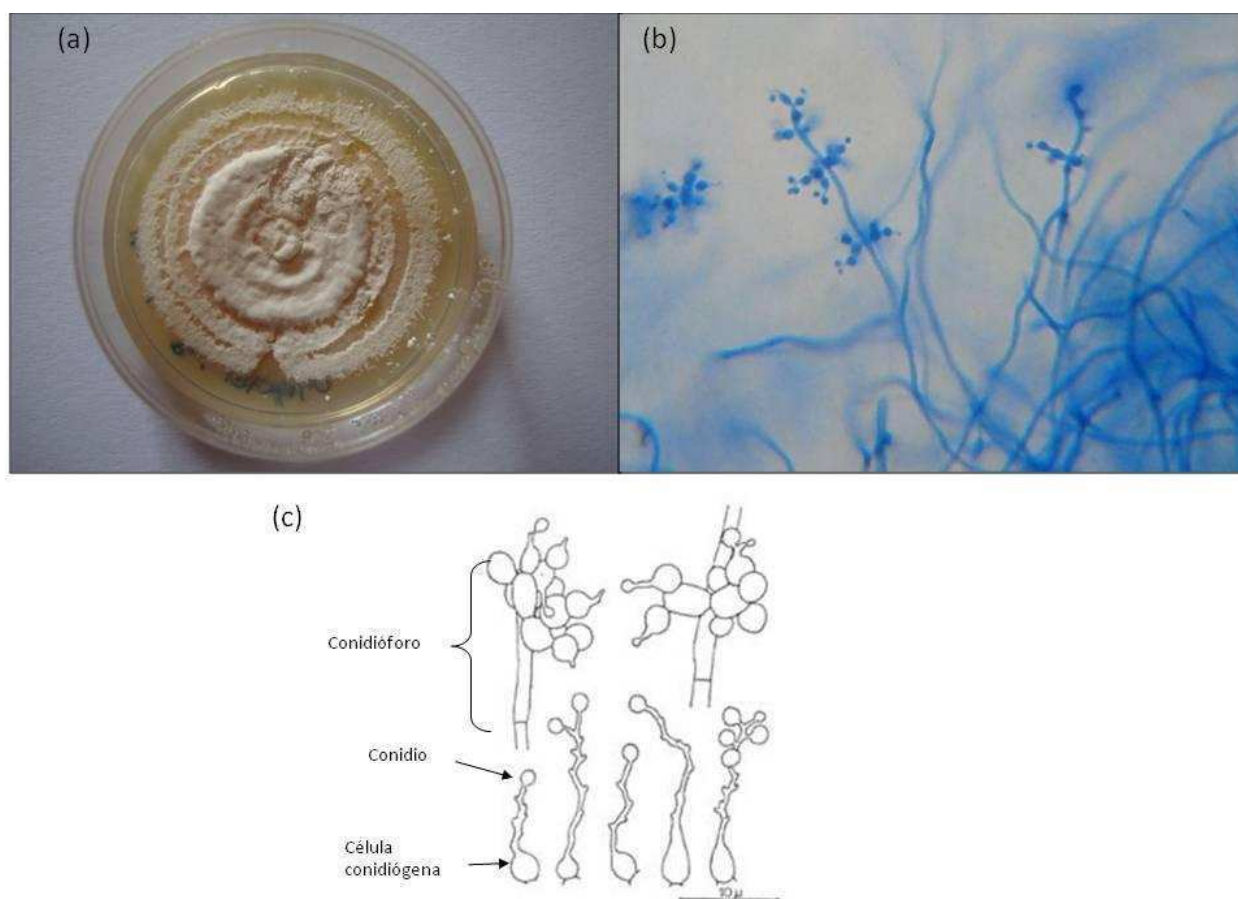


Figura 1.4. (a) Colonia monospórica de *B. bassiana* crecida sobre una placa de Petri con medio de cultivo agarizado (AMC); (b) Estructuras de fructificación de *B. bassiana* bajo microscopio óptico, teñidas con azul de algodón en lactofenol de Ammann 0,5/ p/ v (400X); (c) Estructuras de fructificación de *B. bassiana*.

1.3.4. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin

El género *Metarhizium* Sorokin está compuesto por hongos entomopatógenos anamórficos que generalmente presentan coloración verdosa cuando esporulan sobre los cuerpos de artrópodos hospedadores o sobre medios de cultivo axénicos (Figura 1.5a). *M. anisopliae* pertenece a un complejo dentro del phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae. Este hongo presenta una ontogenia enteroblástica fialídica, la célula conidiógena es una fialide. Los conidióforos son discretos, forman conidiomas y los conidios son ameroconidios, cilíndricos, hialinos a verdosos, en cadenas basípetas que se unen formando columnas (Figura 1.5b y c). Inicialmente la pigmentación de los conidios es blanca, tornándose amarilla en el desarrollo temprano del conidio (4-7 días) y luego verdosa cuando los conidios ya están maduros (Boucias y Pendland, 1998; Bischoff et al., 2009). Generalmente son aislados de suelos o parasitando un amplio rango de especies de insectos, tanto en regiones tropicales como templadas. Especies de este género son utilizadas como agentes de control biológico en el manejo de varias especies de la familia Acridoidea (Lomer et al., 2001). Además, *M. anisopliae* ha sido efectiva en el control del mosquito vector de la malaria (Diptera: Culicidae) (Scholte et al., 2005).

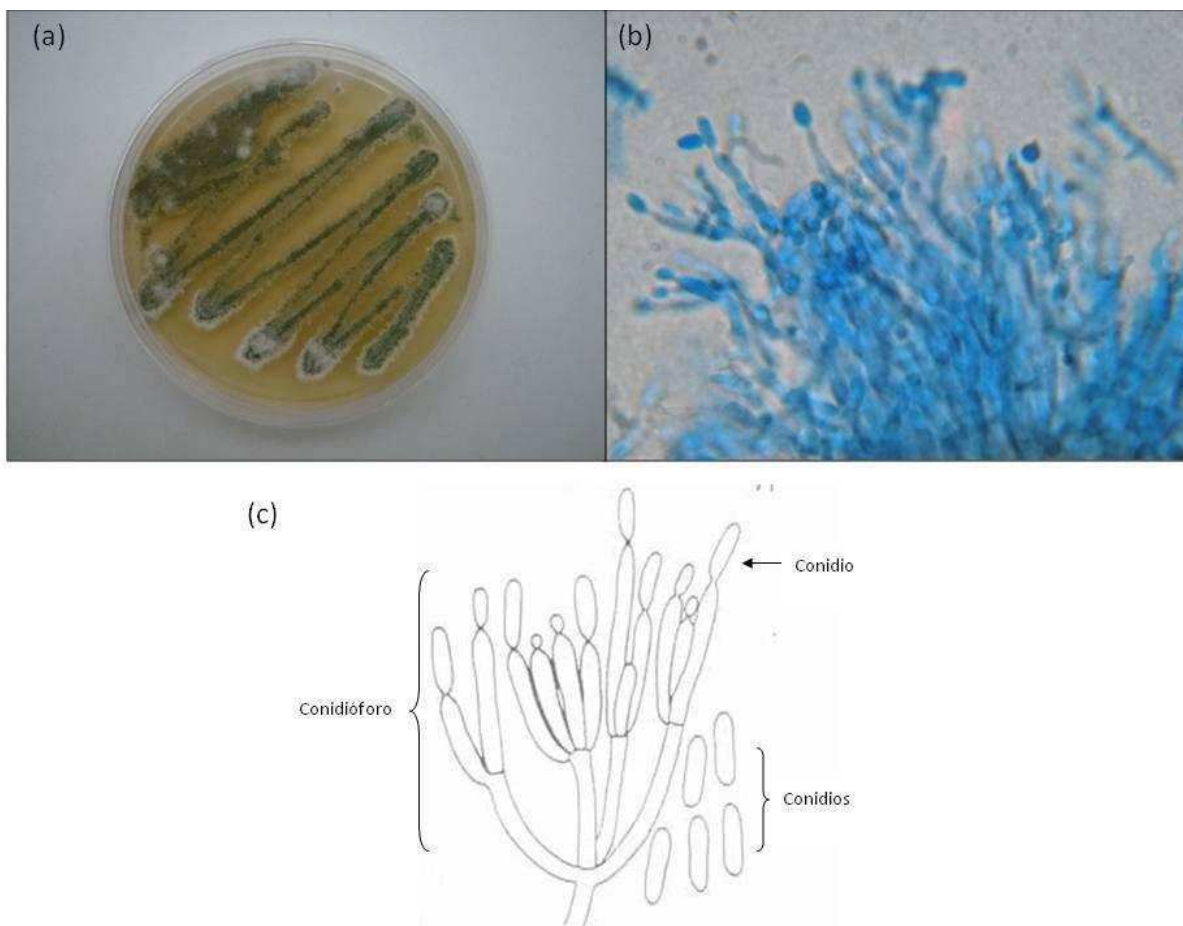


Figura 1.5. (a) Colonia de *M. anisopliae* crecida sobre una placa de Petri con medio de cultivo agarizado (APG); (b) Estructuras de fructificación de *M. anisopliae* bajo microscopio óptico, teñidas con azul de algodón en lactofenol de Ammann 0,5/ p/v (400X); (c) Diagrama de estructuras de fructificación de *M. anisopliae*.

1.4. Objetivos e hipótesis

El objetivo general del trabajo es seleccionar aislamientos nativos de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* virulentos para el picudo del algodón con la finalidad de emplearlos como control microbiano dentro de una estrategia de Manejo Integrado de Plagas (MIP).

Objetivos específicos

- 1) Estimar los parámetros biológicos y poblacionales mediante la elaboración de una tabla de vida de *A. grandis* criado en condiciones de laboratorio sobre la cual se realizarán los bioensayos.
- 2) Obtener distintos aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a partir de cadáveres de insectos y muestras de suelo provenientes de localidades endémicas para dicha plaga.
- 3) Evaluar la patogenicidad y virulencia de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* obtenidos en el marco de la tesis y de aislamientos obtenidos de una micoteca, sobre adultos de *A. grandis* y seleccionar aquellos que presenten mayor virulencia.
- 4) Estudiar efectos subletales sobre la alimentación y oviposición de hembras de *A. grandis* durante el período de incubación de la enfermedad producida por los aislamientos seleccionados.
- 5) Realizar análisis de compatibilidad en laboratorio entre los aislamientos y los agroquímicos comúnmente utilizados en cultivos de algodón.
- 6) Evaluar si existe un efecto sinérgico, aditivo o antagónico entre los insecticidas químicos y los aislamientos seleccionados.
- 7) Determinar el efecto de la temperatura sobre los aislamientos y evaluar la influencia de la temperatura de incubación en la mortalidad de adultos de *A. grandis* causada por *B. bassiana* y *M. anisopliae*.
- 8) Evaluar los parámetros de producción masiva en laboratorio de conidios de los aislamientos seleccionados.

- 9) Desarrollar formulaciones experimentales del micoinsecticida y evaluarlas en jaulas en el campo.

Hipótesis:

Es posible el aislamiento de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a partir de cadáveres de insectos y muestras de suelo provenientes de localidades endémicas para dicha plaga. Algunos de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* obtenidos serán patógenos y presentarán mayor virulencia a los adultos de picudo. Los aislamientos frescos obtenidos presentarán mayor virulencia respecto a los aislamientos más antiguos pertenecientes en la micoteca.

Además, los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* seleccionados producirían efectos subletales en las hembras de *A. grandis* reduciendo los comportamientos de alimentación y reproducción, y por lo tanto disminuyendo el impacto sobre los cultivos de algodón.

Algunos de los aislamientos de hongos entomopatógenos seleccionados presentarán mayor compatibilidad con insecticidas químicos utilizados contra *A. grandis* y estos aislamientos tendrían un efecto sinérgico sobre la mortalidad al utilizarlos en conjunto con insecticidas de origen químico.

Respecto a la temperatura, existiría una variabilidad en la resistencia natural de los distintos aislamientos a la temperatura y además, este factor podría influenciar el proceso de infección fúngica.

Por último, debe ser posible la producción masiva de los aislamientos seleccionados y su formulación para su utilización en el campo en un control biológico del tipo inundativo dentro de una estrategia de Manejo Integrado de Plagas.

Capítulo 2

Materiales y Métodos generales

2.1. Mantenimiento de hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos utilizados en este trabajo fueron obtenidos a partir de muestras de suelo e insectos muertos de distintas localidades de la Argentina, además de aislamientos obtenidos de la micoteca perteneciente al Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), INTA, Castelar. Esta colección cuenta con más de 300 aislamientos de *B. bassiana* y 80 de *M. anisopliae*. Dentro de la colección, los aislamientos son conservados como cultivos esporulados utilizando distintos métodos de conservación con el objetivo de preservarlos en su estado original. Se conoce que repetidos subcultivos pueden llevar a cambios deletéreos como pérdida de patogenicidad, virulencia o esporulación (Fargues & Robert, 1983; Humber, 1997b), por este motivo es importante contar con aislamientos que conserven sus características originales.

Los medios de cultivo empleados varían con la especie fúngica. Para *B. bassiana* se utiliza Agar Medio Completo (AMC), compuesto por (g/L): fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 0,4; fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) 1,4; sulfato de magnesio (SO_4Mg) 0,6; cloruro de potasio (KCl) 1; nitrato de amonio (NH_4NO_3) 0,7; glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 10; extracto de levadura 5; Agar 20. Para *M. anisopliae*, se utiliza Agar Papa Glucosado (APG; Oxoid). Los cultivos son conservados en tubos pico de flauta a 4 y -10 °C, en tubos de 1,5ml con Glicerol (20%) a -10 °C, y también son conservados los conidios liofilizados a 4 °C. Esta última técnica utilizada permite que los conidios permanezcan activos por varios años (Humber, 1997b).

2.2. Preparación de suspensiones de conidios, titulación y evaluación de la viabilidad

Las suspensiones de conidios para la realización de los bioensayos fueron obtenidas de la siguiente manera. Los aislamientos de *B. bassiana* fueron repicados de la colección en AMC

con el agregado de cloranfenicol (0,5/) durante 10 a 15 días hasta observarse esporulación. Luego, los conidios fueron obtenidos raspando la superficie de la placa de Petri con una espátula dentro de una cabina de bioseguridad en condiciones asépticas. Los conidios obtenidos se colocaron en tubos de ensayo con 10 ml de Tween 80 (0,05/) y la concentración de las suspensiones obtenidas fue calculada utilizando una cámara de Neubauer. Las mismas fueron ajustadas a la concentración requerida en cada bioensayo con Tween 80 (0,05/).

Para las suspensiones de conidios de *M. anisopliae*, los conidios fueron obtenidos a partir de polvo producido en arroz. Para ello, se colocaron 90 g de arroz parbolizado en bolsas de polipropileno y se adicionaron 45 ml de agua destilada estéril, una vez que el arroz absorbió el agua, este se esparció dentro de la bolsa homogéneamente hasta lograr una lámina delgada. Las bolsas se cerraron y se colocaron en autoclave durante 20 min. a 120 °C y 1 atmósfera de presión. El arroz se inoculó (dentro de una cabina de flujo laminar) con 1 ml de una suspensión de conidios (1×10^7 conidios/ml) de la cepa a producir. Las bolsas se incubaron a 26 °C durante 7 y 10 días. Finalizado el tiempo de incubación, las bolsas se abrieron y el arroz se secó hasta una HR < 10/ durante un período de 48 h. El arroz seco se tamizó durante 15 min a 460 rpm a fin de separar los conidios de los granos de arroz. Los conidios obtenidos fueron pesados y colocados en tubos de ensayo con Tween 80 (0,05/). Se estimó la concentración obtenida utilizando una cámara de Neubauer y las mismas fueron ajustadas a la concentración requerida en cada bioensayo con Tween 80 (0,05/).

Para evaluar la viabilidad de los conidios se utilizaron dos técnicas (Wraight et al., 2007):

- Unidades formadoras de colonias (UFC): se siembran distintas diluciones 1:10 de una suspensión madre en placas de Petri, dispersando bien los conidios sobre la superficie de la misma, y se cuentan las colonias a las 72 h. Se calcula la concentración de la suspensión madre.
- Germinación: Se siembra sobre placas de Petri 100 µl de una suspensión de conidios de $1 - 2 \times 10^7$ conidios/ml dispersando sobre toda la superficie. Luego de 24 h se calcula el porcentaje de conidios germinados contando aquellos germinados y no germinados.

2.3. Población de insectos experimentales. Cría masiva del picudo del algodónero

La cría del picudo fue iniciada en febrero de 2008 en el IMYZA (Lecuona, 2009). Para el desarrollo de la misma fue construido un Laboratorio de Cría del Picudo del Algodonero cumpliendo con los requisitos solicitados por el SENASA (Figura 2.1). Los adultos y larvas de una población no diapausante de *A. grandis* fueron capturados en zonas rurales de la localidad de Florencia, Provincia de Santa Fe, Argentina (28° 5' 06.11" S; 59° 14' 37.53" W; Florencia). Las colonias de insectos fueron criados en salas climatizadas a 27 ± 1 °C, 50 ± 10 / HR, con un fotoperiodo de 12:12 luz:oscuridad, y alimentados en dieta artificial según modificaciones realizadas sobre la metodología propuesta por Monnerat et al. (1999).



Figura 2.1. Laboratorio de cría del picudo del algodónero ubicado en el INTA, Castelar, Buenos Aires, Argentina.

Las jaulas empleadas para adultos son recipientes plásticos con fondos de malla plástica y tapas de *voile* colocadas dentro de otro recipiente similar para la recolección de heces y huevos (Figura 2.2). Los huevos fueron colectados cada dos días, lavados con agua,

desinfectados con cloruro de benzalconio (0,3/) y sembrados sobre la superficie de una dieta artificial. De esta forma, las larvas eclosionan, se alimentan y completan el desarrollo de los estados inmaduros sobre la dieta. Una vez que se formadas las pupas e iniciada la emergencia, los adultos fueron retirados y transferidos a las jaulas de oviposición (Figura 2.3). La dieta empleada para larvas y adultos está basada en agar, harina de algodón, soja, germen de trigo, glucosa, levadura, azúcar, sales minerales y vitaminas (Lecuona, 2009). Además, a la dieta se le agregan conservantes que permiten utilizarla sin el problema de contaminación fungica o bacteriana.



Figura 2.2. Adultos de picudo del algodnonero dentro de las jaulas de cría sobre dieta artificial.

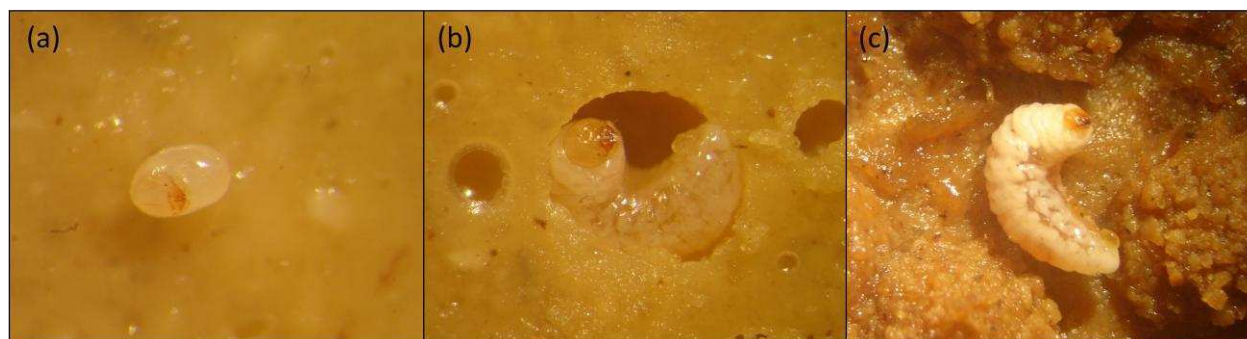


Figura 2.3. (a) Huevos, (b) larva de segundo estadio, (c) larva de tercer estadio de *A. grandis* criado sobre la dieta artificial.

2.4. Bioensayos con adultos de *A. grandis*

Los adultos de *A. grandis* utilizados para los bioensayos fueron obtenidos de la cría de laboratorio. Los adultos recién emergidos, que se identifican por poseer una coloración rojiza debido a que todavía no se produjo la esclerotización de la cutícula (Cuadrado, 2002), fueron separados de la cría y colocados en recipientes con dieta artificial. La dieta utilizada para los bioensayos es la utilizada en la cría masiva pero sin el agregado de tres de los compuestos anticontaminantes (ácido sórbico, nistatina y nipagim) debido a que pueden tener efectos inhibitorios sobre los hongos entomopatógenos a ensayar. A esta dieta se la llamó dieta sin anticontaminantes. Los adultos fueron alimentados con esta dieta 24 h antes de la realización de los ensayos. Los bioensayos consistieron en la inoculación del hongo por el método de inmersión, sumergiendo a los insectos en una suspensión de conidios durante 15 segundos. Las suspensiones de conidios utilizadas fueron preparadas según lo detallado en 2.2. Los adultos inoculados fueron colocados sobre papel para absorber el exceso de líquido sobre los insectos y se colocaron en envases plásticos de 86 mm de diámetro x 101 mm de altura (Polistor S.R.L.) tapados con *voile* y colocados a temperatura y humedad controladas (según el ensayo) y fotofase de 12 h. Luego del bioensayo, los picudos adultos fueron alimentados con dieta sin anticontaminantes las primeras 24 h y luego fueron alimentados con la dieta común utilizada en la cría masiva del picudo, la cual fue cambiada cada dos días hasta la finalización del bioensayo.

Capítulo 3

Parámetros biológicos y poblacionales de *A. grandis* en cría artificial

3.1. Introducción

El daño en el algodón producido por *A. grandis* se genera cuando los adultos se alimentan y oviponen sobre los pimpollos florales o las cápsulas pequeñas. Las hembras de picudo eligen los pimpollos más grandes para la oviposición, generalmente entre 5,5 y 8 mm de diámetro, depositando un único huevo por sitio de oviposición, y por lo general una única oviposición por pimpollo (Everett y Earle, 1964; Showler, 2004; Showler, 2005; Esquivel, 2007). Las hembras hacen una perforación con el pico y en cada hueco depositan un huevo hasta alcanzar un promedio de 119 huevos pudiendo llegar a un máximo individual de 368 huevos (Cross, 1973; Monnerat et al., 2002). Everett y Earle (1964) y más tarde Ferguson y Williams (1991) proponen que durante la oviposición se depositan compuestos que actúan disuadiendo a otras hembras de reutilizar ese sitio de oviposición, disminuyendo la competencia y aumentando el *fitness* de los estadios inmaduros (Greenberg et al., 2003).

Existen tres estadios larvales con desarrollo endófito. Las larvas nacen luego de 3 a 5 días y comienzan a alimentarse de los órganos reproductivos del pimpollo ocasionando grandes pérdidas, debido a que durante el segundo o tercer estadio larval, estas producen una proteína que causa la abertura de las brácteas y posterior abscisión del pimpollo (Parrott et al., 1970; Monnerat et al., 2002; Santos et al., 2003). Aproximadamente 6 h antes de que se forme la pupa, las larvas disminuyen su actividad y dejan de alimentarse, este estado se conoce como prepupa; aunque no se evidenció una muda entre el tercer estadio larval y la prepupa, se observa un aplanamiento y ensanchamiento de los segmentos abdominales (Parrott et al., 1970). Una vez que el adulto es maduro emerge saliendo del pimpollo o cápsula en la que se desarrolló. Las primeras horas posteriores a la emergencia del adulto, su exoesqueleto no está completamente esclerotizado y posee una coloración rojiza. Los adultos recién emergidos generalmente aguardan en las flores abiertas donde se pueden alimentar del polen mientras completan el proceso de esclerotización, el cual tarda cerca de 24 h tomando una coloración grisácea. Luego de la cópula, las hembras de 3 a 5 días de edad comienzan a depositar los

huevos. Durante este tiempo, conocido como período de preoviposición, las hembras se alimentan probablemente utilizando estos recursos en la maduración de los oocitos. El período que media entre la oviposición y la emergencia de los adultos es muy breve en condiciones óptimas de temperatura y humedad por lo cual podrían haber entre siete y diez generaciones superpuestas en un año de cultivo (Lanteri et al., 2003).

Como con todos los insectos, la tasa de desarrollo está fuertemente influenciada por factores ambientales como el fotoperíodo y la temperatura (Spurgeon y Raulston 1998; Greenberg et al., 2005b; Greenberg et al., 2008) tanto como el sustrato de cría donde se realizan las investigaciones (dieta artificial o pimpollos de diferentes especies de malváceas) (Cross, 1973; Gabriel, 2002; Monnerat et al., 2002). Sin embargo, en términos generales, el ciclo de vida de *A. grandis* es completado entre los 17 y 21 días (Cross, 1973).

Las tablas de vida son importantes para el estudio de la dinámica de las poblaciones animales, especialmente artrópodos, como un proceso intermediario para estimar los parámetros relacionados con el crecimiento poblacional potencial, llamados parámetros demográficos (Southwood, 1995; Maia, et al, 2000). La duración de las fases de desarrollo y la estimación del crecimiento poblacional obtenidos de una tabla de vida de fertilidad, constituyen importantes parámetros biológicos. Los principales parámetros asociados con una tabla de vida de fertilidad son: tasa neta de reproducción (R_0), tasa intrínseca de crecimiento (r_m), tiempo generacional medio (T), tasa finita de crecimiento (λ) y tiempo de duplicación (D) (La Rossa y Kahn, 2003). El cálculo de estos parámetros ayuda a explicar las oscilaciones en la densidad poblacional y proveen un mejor entendimiento de la dinámica poblacional de una especie. El conocimiento de los parámetros biológicos y poblacionales de la especie constituye una importante herramienta para desarrollar y establecer tácticas de manejo de una plaga (Toapanta et al., 2005). Por ejemplo, mediante la comparación del potencial de crecimiento expresado a través de las tasas r_m y λ , es posible evaluar la incidencia de productos naturales o de síntesis sobre la biología del insecto plaga (Toapanta et al., 2005).

El objetivo de este estudio fue construir una tabla de vida y calcular los parámetros biológicos de una población de *A. grandis* criada en condiciones controladas de laboratorio y sobre dieta artificial. Esta cría será utilizada en los bioensayos de los capítulos contiguos.

3.2. Materiales y Métodos

Fue estudiada una cohorte criada sobre dieta artificial en condiciones de laboratorio según lo explicado en el Capítulo 2. Para ello se partió de 64 huevos que fueron colocados sobre dieta artificial y mantenidos a 27 ± 1 °C, 50 – 60% de humedad relativa y fotofase de 12 h. Fue registrado diariamente los cambios de estado (huevo, larva, pupa y adulto) y la mortalidad en cada uno de ellos. Una vez emergidos los adultos, los mismos fueron sexados según Sappington y Spurgeon (2000) (Figura 4.2; Capítulo 4). Se armaron parejas y fue registrado diariamente el número de huevos por hembra hasta su muerte.

Los parámetros biológicos obtenidos fueron:

- a. Períodos de estadios inmaduros, huevo, larva, prepupa y pupa.
- b. Período de preoviposición, desde que nace la hembra hasta que comienza la oviposición.
- c. Período de oviposición, tiempo que transcurre desde la puesta del primero hasta el último huevo.
- d. Longevidad de las hembras adultas.
- e. Número de huevos depositado por hembra por día y en toda su vida

A partir de la confección de tablas de vida se estimaron los siguientes parámetros poblacionales utilizando un programa específico para el procesamiento de datos provenientes de cohortes de laboratorio, denominado TABLAVI, el cual aplica el método “Jackknife” para el cálculo de los estimadores, intervalos de confianza del 95% y los correspondientes errores estándar, con los que es posible efectuar comparaciones entre las cohortes (La Rossa y Kahn, 2003):

- a. Tasa neta de reproducción (R_0): número de descendientes producidos en una generación por hembra.
- b. Tasa intrínseca de crecimiento natural (r_m): tasa de cambio de tamaño de la población por individuo por unidad de tiempo. Este estimador puede ser utilizado con carácter predictivo y comparativo. El error estándar del estimador de r_m se calculó con el procedimiento “Jackknife”.
- c. Tasa finita de incremento (λ): coeficiente por el cual la población se multiplica sobre sí misma por unidad de tiempo.
- d. Tiempo generacional medio (T): período que transcurre en promedio entre el nacimiento de una madre y el nacimiento de su descendencia.
- e. Tiempo de duplicación (D): número de unidades de tiempo requerido por la población para duplicarse en número.

Para la confección de la tabla de vida, fueron ingresados al programa los datos de las hembras y los de los estadios inmaduros que no sobrevivieron pero que habrían llegado a ser hembras, utilizando proporción de sexos 1:0,83 hembras:machos, y suponiendo que la mortalidad de los estados inmaduros de las hembras y de los machos es la misma.

3.3. Resultados

El período de desarrollo de los estados inmaduros se detalla en la Tabla 3.1 y Figura 3.1. La proporción de sexos obtenida fue hembras:machos 1:0,83. El total de tiempo desde que la hembra del picudo pone el huevo hasta que este llega a adulto fue en promedio $18,64 \pm 1,69$ días, registrándose la mayor mortalidad en el estado de huevo ($42,19\%$). Las hembras adultas vivieron en promedio $74,2 \pm 32,0$ días. Al evaluar el número de huevos puestos por hembra en función del tiempo, se observa que los primeros cuatro días corresponden al periodo de preoviposición (Tabla 3.2). Luego de este período el número de huevos puestos por día

aumenta rápidamente alcanzando un máximo entre los días 15 a 19 de emergidas las hembras adultas (Figura 3.2a). Luego del día 32 de emergida la hembra, se redujo la tasa de oviposición y comenzó la mortalidad. A los 72 días de emergidas las hembras, el 90% de los huevos fueron ovipuestos, y cerca del día 86 la tasa de oviposición va tendiendo a cero, lo cual concuerda con los períodos finales de la vida de la hembra (Figura 3.2b). La supervivencia media calculada fue a los 63 días (mediana) (Figura 3.3).

Los parámetros obtenidos para la cohorte estudiada fueron tasa neta de reproducción (R_0) $176,35 \pm 23,95$ hembra/hembra/generación; tasa finita de incremento (λ) $1,160 \pm 0,007$ hembra/hembra; tasa intrínseca de crecimiento natural (r_m) $0,148 \pm 0,006$ hembra/hembra/día; tiempo generacional medio (T) $35,05 \pm 0,91$ días. Estos valores indican un crecimiento poblacional, siendo el tiempo de duplicación (D) de $4,66 \pm 0,19$ días.

Tabla 3.1. Duración de los estados inmaduros de *A. grandis* en cría sobre dieta artificial bajo condiciones controladas de laboratorio a 27 °C, 50% HR, 12:12 de fotoperiodo.

Estado	Duración estado (días)	Mínimo (días)	Máximo (días)	N	/ mortalidad por estadio
Huevo	$2,32 \pm 0,47$	2	3	64	42,19
Larva	$9,71 \pm 0,71$	8	11	37	5,41
Prepupa	$1,94 \pm 1,26$	1	7	35	0
Pupa	$4,67 \pm 0,48$	4	5	35	0
Total estados inmaduros	$18,64 \pm 1,69$	16	23	35	0

Tabla 3.2. Duración de los períodos de preoviposición, oviposición, longevidad de las hembras adultas y número de huevos ovipuestos por hembra de *A. grandis*.

	Promedio ± DS	Mínimo	Máximo	N
Longevidad	74,24 ± 31,96 días	35	127	17
Período preoviposición	4,71 ± 1,26 días	3	8	17
Periodo oviposición	59,88 ± 29,79 días	21	117	17
Número huevos / hembra	397 ± 119 huevos	166	544	17

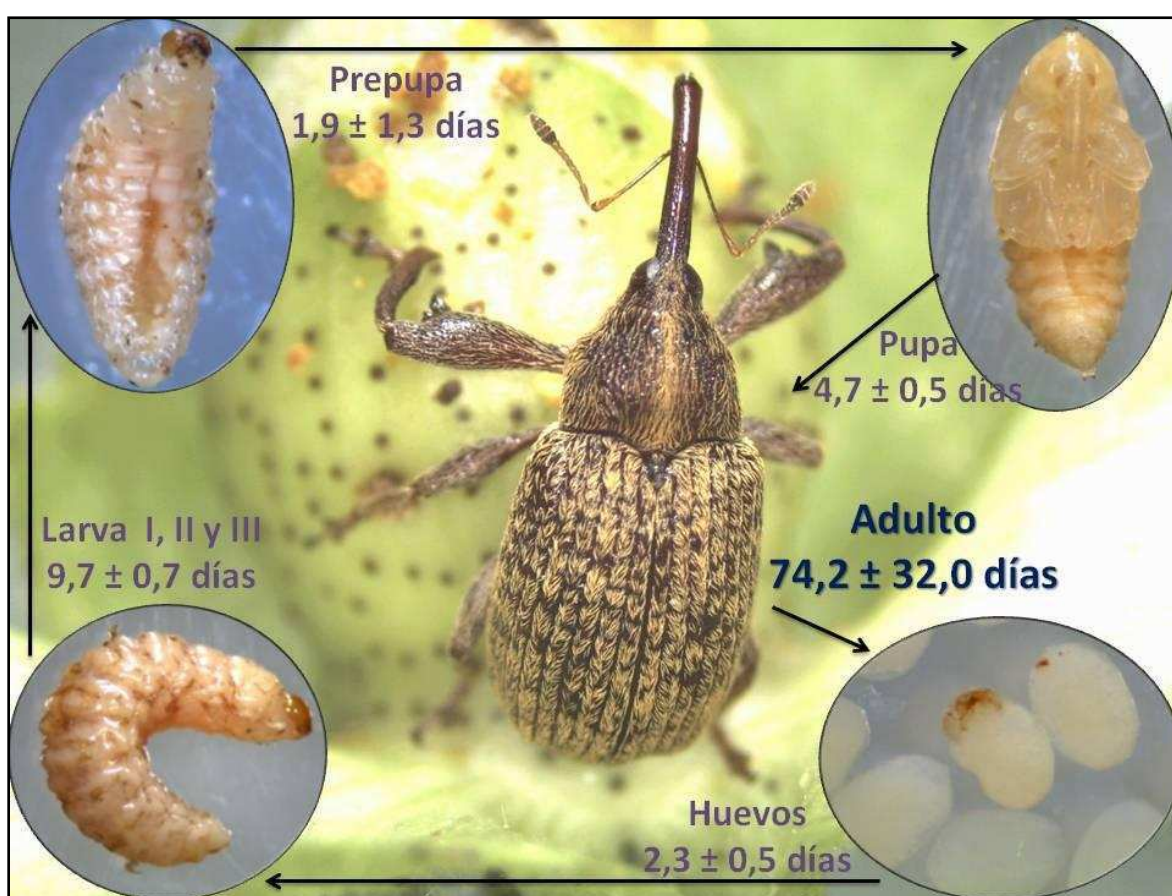


Figura 3.1. Estados del ciclo de vida del picudo del algodón y duración estimada de cada estadio en condiciones controladas de laboratorio a 27 °C, 50/ HR y fotofase 12 h.

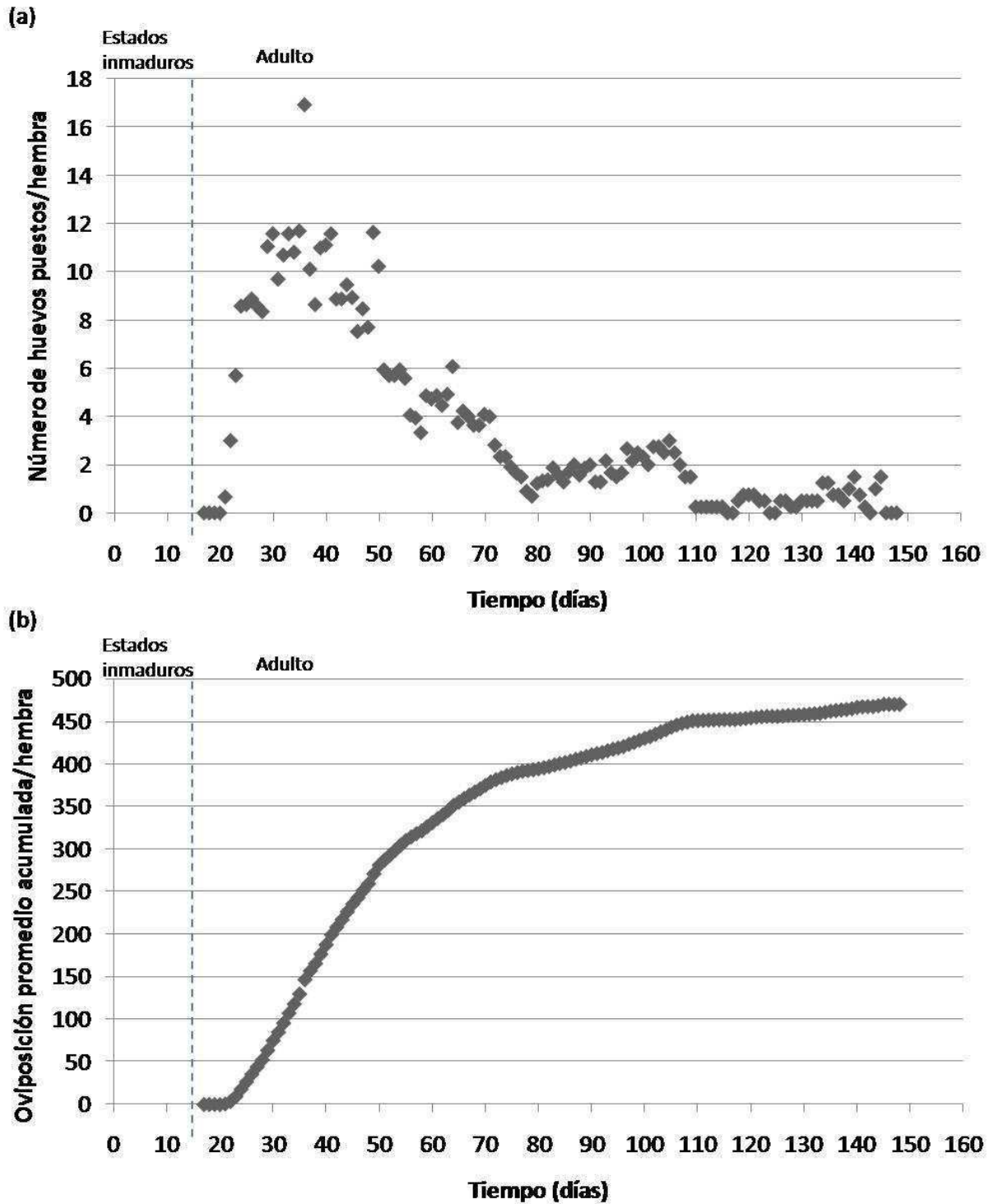


Figura 3.2. (a) Número de oviposiciones por hembra de *A. grandis* por día; y (b) Curva de oviposición acumulada lo largo de su vida desde su eclosión (día 0).

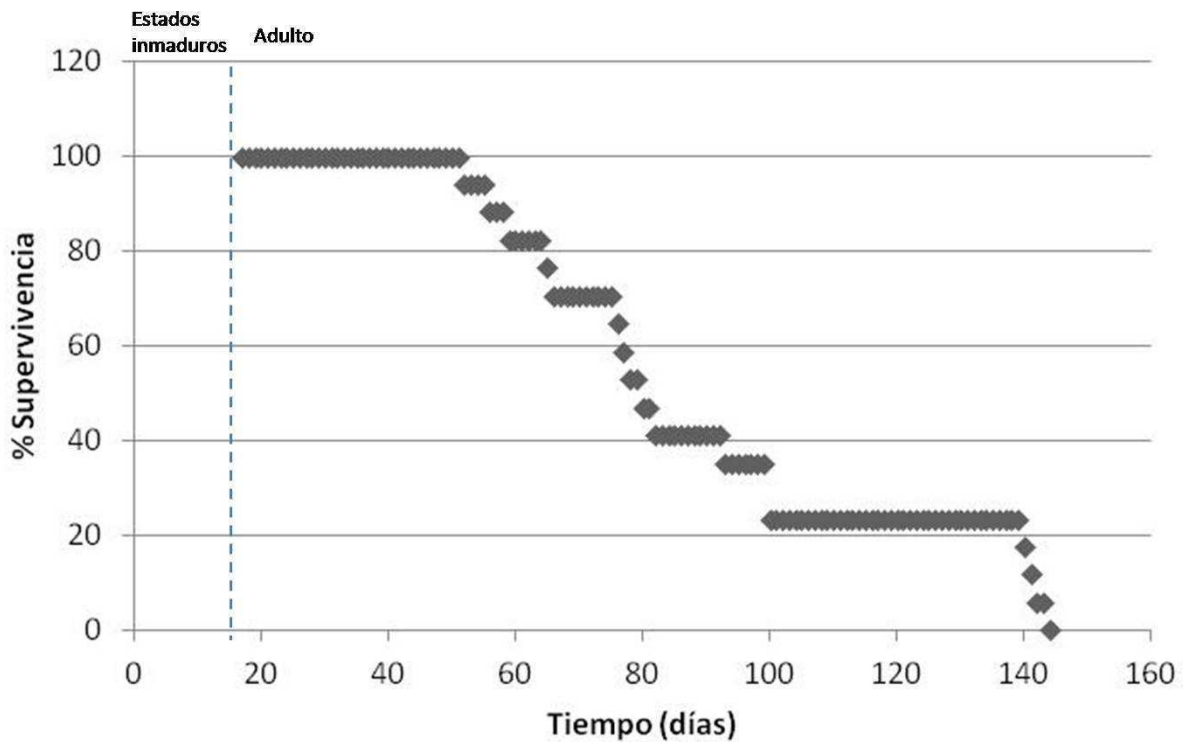


Figura 3.3. Porcentaje de supervivencia de las hembras de *A. grandis*.

3.4. Discusión

Respecto a la oviposición, se observó que las hembras de *A. grandis* concentran el máximo esfuerzo reproductivo al inicio de su vida. La tasa de oviposición aumenta rápidamente obteniendo un pico de oviposición al inicio de la vida y luego desciende hasta la muerte de las hembras. Un modelo similar fue observado por Greenberg et al. (2005b; 2008), donde la oviposición de hembras de *A. grandis* a distintos fotoperiodos y temperaturas mostró un temprano incremento hasta un pico, luego un *plateau* y disminución posterior. Rabinovich (1980) encuentra que si bien existe una variabilidad en relación con el esfuerzo reproductor en función de la edad para distintas especies de artrópodos, es común que haya una edad donde se concentra el máximo esfuerzo reproductivo, por lo general esto ocurre en edades tempranas del periodo de madurez reproductiva. Por otro lado, las condiciones abióticas como la

temperatura, la humedad y el fotoperiodo tienen influencia en el periodo de oviposición (Greenberg et al., 2005a; 2008).

Por último, comparando la duración del desarrollo de los estados inmaduros de los picudos obtenido en este trabajo de 19 días con el ciclo fenológico del algodón de aproximadamente 180 días (Capítulo 1), se puede concluir que esta plaga aparece en la fase inicial del cultivo, donde, luego de 30 días aparecen los primeros pimpollos y las hembras comienzan a alimentarse y oviponer. La población de *A. grandis* tendría un potencial de entre 7 y 8 generaciones por ciclo del cultivo (anual). Este resultado apoya que el picudo del algodonnero es considerado una importante plaga del cultivo debido a su alto poder reproductivo, representando una elevada capacidad de postura y reducido ciclo biológico. Sin embargo, este valor es hipotético debido a que en el campo existen otros factores que influyen en la supervivencia y fecundidad de las hembras.

La información obtenida en este trabajo, fue utilizada para el planeamiento de la cría del picudo y de los bioensayos. Asimismo, el estudio comparativo de la biología permitió la evaluación de efectos subletales causados por los microorganismos.

Capítulo 4

Selección de hongos entomopatógenos virulentos para el picudo del algodónero

Nussenbaum, A.L., Lecuona, R.E., 2012. Selection of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato isolates as microbial control agents against the boll weevil (*Anthonomus grandis*) in Argentina. Journal of Invertebrate Pathology. 110: 1-7.

4.1. Introducción

4.1.1. Hongos entomopatógenos en el control del picudo del algodónero

En la búsqueda de un agente de control microbiano apropiado, es importante considerar varias características de la especie seleccionada. En primer lugar, el hongo debe ser patógeno o capaz de matar al hospedador específico que se busca controlar. El proceso infectivo de los hongos entomopatógenos involucra un complejo de interacciones con los insectos hospedantes que puede variar entre las especies de hongos y entre las distintas cepas de la misma especie (Castrillo et al., 2005). En general, para encontrar y desarrollar hongos como agentes de control biológico se debe comenzar por la selección de la especie más apropiada a partir de una serie de candidatos posibles, y luego seleccionar los aislamientos patógenos dentro de dicha especie. Para ello se debe determinar la eficacia del patógeno contra el hospedador *target* y elegir la mayor cantidad de aislamientos apropiados, optimizando los procedimientos de crecimiento, formulación y aplicación, determinando si el patógeno es seguro para organismos *no target* (vertebrados e invertebrados), y por último, evaluando si es posible un registro gubernamental del ingrediente activo (hongo) y del producto final (Humber, 2009).

Los factores que determinan si la interacción hongo-artrópodo logra producir una infección exitosa están relacionados con la especificidad en la adhesión y germinación de los conidios en la cutícula del insecto y la evasión exitosa de las defensas del hospedador (Shah y Pell, 2003; Capítulo 1). La adhesión del conidio a la cutícula puede involucrar mecanismos específicos receptor-ligando y/o mecanismos inespecíficos (Fargues y Remaudiere, 1977; Bidochka et al., 1995; Holder y Keyhani, 2005). Por este motivo, para el desarrollo de un micoinsecticida, es importante dedicar un esfuerzo inicial en seleccionar cepas altamente virulentas para la plaga que se intenta controlar.

Los hongos más frecuentemente utilizados para el control de plagas son *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, *L. muscarium*, *L. longisporum*, *Nomurea rileyi*, *Isaria fumosorosea* e *I. farinosa*, debido a que tienen un amplio rango de hospedadores, son fáciles de manipular en cultivo, de producir y formular (Humber, 2009). Se sabe que los insectos de la familia Curculionidae son susceptibles a la infección por *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Estas dos especies de hongos han sido evaluadas como posibles agentes de control microbiano contra varias especies de curculionidos como *Callosobruchus maculatus* (Murad et al., 2006), *Conotrachelus nenuphar* (Alston et al., 2005), *Metamasius spinolae* (Tafoya et al., 2004), *Rhynchophorus ferrugineus* (Dembilio et al., 2010), *Sitophilus zeamais* (Adane et al., 1996). Además se demostró que estos hongos son capaces de causar muerte del picudo del algodón, tanto en laboratorio (Wright y Chandler, 1991; Silva, 2001; Giometti et al., 2010) como en el campo (Wright y Chandler, 1992; Wright, 1993). En particular, existen trabajos en otros países donde se seleccionaron cepas de estas especies de hongos para el control del picudo del algodón (McLaughlin, 1962; Wright, 1993; Wright y Chandler, 1991; 1992; Bleicher et al., 1992; Oliveira et al., 1994; Silva, 2001). Sin embargo, no existen aislamientos nativos seleccionados contra esta plaga, que debido a las normativas del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), sea posible el registro y utilización como micoinsecticidas en la Argentina.

4.1.2. Aislamiento de cepas nativas de hongos entomopatógenos

En la naturaleza, los hongos entomopatógenos pueden ser aislados de distintas fuentes. El suelo es uno de los sitios más comúnmente utilizado para el aislamiento de hongos entomopatógenos hipocreales. Muchas especies pueden ser encontradas tanto en suelos cultivados como en hábitats naturales. En el suelo los hongos entomopatógenos pueden persistir, pero la proliferación y dispersión son limitadas. La población de conidios del suelo proviene de los conidios infectivos liberados tras la esporulación sobre los cadáveres de los artrópodos hospedadores (Castrillo et al., 2005; Meyling y Eilenberg, 2007).

Por otro lado, los hongos entomopatógenos se pueden encontrar en la naturaleza infectando distintas especies de artrópodos. Estos pueden ser colectados en el campo e incubados en laboratorio para aislar los conidios infectivos. Por ejemplo, *B. bassiana* ha sido encontrado como patógeno natural en más de 700 especies de hospedadores. El número de conidios liberados por hospedador depende de la especie de hongo, especie de hospedador y el tamaño del hospedador (Meyling y Eilenberg, 2007). Por último, existen algunas evidencias de los últimos años donde se sugiere que *B. bassiana* y *M. anisopliae* tienen el potencial para participar en las interacciones planta-hongo como endófitos (Vega et al., 2008; Vega et al., 2009).

4.1.3. Efectos subletales de los hongos entomopatógenos

Si bien la relación entre hospedador y el patógeno por lo general es considerada únicamente en términos de virulencia, un aspecto importante de los hongos entomopatógenos es la producción de efectos subletales, los cuales tienen una repercusión en la dinámica poblacional de las especies susceptibles. Las alteraciones comportamentales producidas por los hongos entomopatógenos afectan parámetros esenciales para la evolución de los patógenos y los hospedadores, como la transmisión y la longevidad (Roy et al., 2006).

Los entomopatógenos generalmente requieren varios días para matar a su hospedador. Durante este período, los insectos pueden continuar alimentándose, aumentando el daño del cultivo hasta su muerte (Hajek, 1989; Fargues et al., 1994). Por esta razón, el control microbiano ha sido muy criticado como una alternativa a los insecticidas químicos. Sin embargo, a diferencia de los productos de síntesis, los hongos entomopatógenos poseen asociaciones parasíticas con los hospedadores. Los patógenos y hospedadores coevolucionan, adoptando diversas modificaciones comportamentales, fisiológicas y ecológicas que aumentan el éxito reproductivo y por lo tanto su *fitness*. Sin embargo, existen pocos trabajos donde se

estudien estos efectos producidos por los hongos entomopatógenos, entre los cuales incluyen cambios en el comportamiento y/o alteraciones de los potenciales de supervivencia y reproductivo de la progenie de poblaciones expuestas a estos hongos (Roy et al., 2006; Torrado-León et al., 2006).

Algunos estudios han investigado el efecto de la infección fúngica sobre la alimentación de distintos insectos hospedadores (Roy et al., 2006). Los resultados muestran que en laboratorio, sobre larvas de insectos fitófagos lepidópteros y coleópteros, existe una disminución en el consumo de alimento de larvas infectadas con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respecto a las sanas, probablemente debido a una disminución de la actividad de los insectos infectados (Ekesi, 2001; France et al., 2002; Tefera y Pringle, 2003). De este modo, el daño en los cultivos disminuye durante el tiempo de incubación de la enfermedad debido a que los artrópodos infectados se alimentan menos que los sanos.

El *fitness* de un individuo depende directamente del número de descendientes viables que este produce, y tanto el patógeno como el hospedador adoptan estrategias para maximizar la eficacia reproductiva. Los hongos entomopatógenos producen tanto efectos directos en la fecundidad, como cambios en la producción y en la respuesta a las feromonas sexuales. Estudios en hongos hipocreales han demostrado que los hospedadores infectados generalmente producen menor progenie (Baverstock et al., 2006). Además, cambios en la producción de feromonas sexuales han sido observados principalmente en insectos infectados con hongos pertenecientes al orden Entomophthorales (Furlong et al., 1995; Reddy et al., 1998).

Los objetivos del presente capítulo fueron obtener aislamientos nativos de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* a partir de cadáveres de insectos y muestras de suelo provenientes de localidades endémicas de la plaga. Evaluar la patogenicidad y virulencia de los aislamientos obtenidos en el marco de esta tesis y de aislamientos obtenidos de una micoteca, sobre adultos de *A. grandis* y seleccionar aquellos que presenten mayor virulencia.

Estudiar efectos subletales sobre la alimentación y oviposición de hembras de *A. grandis* durante el período de incubación de la enfermedad producida por los aislamientos seleccionados.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Aislamiento de cepas nativas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

- a) Aislamientos a partir de cadáveres de insectos: Los insectos muertos provenientes de muestras de campo, se colocaron en cámaras húmedas y se incubaron a 26 °C durante 3 a 7 días. Transcurrido dicho período los cadáveres fueron examinados bajo lupa y las cepas de hongos entomopatógenos fueron aisladas.

- b) Aislamientos a partir de muestras de suelo del norte argentino: Se recolectaron muestras de suelo de campos con cultivo de algodón y presencia de *A. grandis* de dos localidades de la provincia de Corrientes (San Roque: 27° 15' latitud S; Mercedes: 59° 37' longitud O), una localidad de la provincia de Formosa (26° 11' latitud S, 58° 18' longitud O) y dos localidades de la provincia de Chaco (Colonia Benitez: 27° 27' latitud S, Pablo Vispo: 58° 51' longitud O). Las muestras de suelo recolectadas se conservaron en heladera a 8 °C hasta su procesamiento. Los aislamientos de hongos entomopatógenos fueron realizados utilizando el método de dilución y sembrando en un medio selectivo. Para ello se pesaron en condiciones asépticas 10 g de suelo que luego fueron transferidos a un frasco Erlenmeyer con 90 ml de Tween 80 (0,05/) estéril. Los frascos fueron agitados durante 10 a 15 minutos en agitador magnético. Se realizaron diluciones decimales seriadas transfiriendo 1 ml de la muestra madre en tubos de ensayo con 9 ml de Tween 80 (0,05/). Se sembraron 100 µl de cada dilución (incluyendo a la solución madre realizada en el Erlenmeyer) dispersando con varilla de vidrio sobre toda la superficie de la placa de Petri conteniendo un medio selectivo Oatmeal-CTAB compuesto por: harina de avena 20 g/l; CTAB 0.6 g/l; agar-

agar 20 g/l; clorotetraciclina 5 mg/l (Posadas et al., 2012). Las placas se incubaron a 26 °C entre 6 y 15 días.

Todos los aislamientos obtenidos a partir de cadáveres de insectos y muestras de suelo, fueron purificados en placas de Petri conteniendo AMC ó APG (según la especie de hongo) con el agregado de antibiótico (Cloranfenicol 0,5/), identificados según Humber (1997a) e incorporados en la micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (IMYZA, INTA Castelar) (Capítulo 2).

4.2.2. Patogenicidad sobre adultos de *A. grandis*

Fue analizada la patogenicidad de los aislamientos de hongos entomopatógenos, realizando un *screening* donde se evaluó la mortalidad sobre adultos de *A. grandis* producida por 66 aislamientos de *B. bassiana* y 28 de *M. anisopliae*. Estos aislamientos fueron los obtenidos en el marco de este trabajo a partir de muestras de suelo y cadáveres de insectos (4.2.1), y además fueron utilizados aislamientos conservados en la micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos, IMYZA (Capítulo 2). El criterio con que se seleccionaron los aislamientos pertenecientes a la micoteca fue intentar incluir una gran variedad de orígenes diferentes, o sea, de distintas especies de artrópodos o suelos de distintas localidades (Anexo 1). Los bioensayos fueron realizados sobre adultos no sexados de 24 h de edad utilizando el método explicado en el Capítulo 2. Los adultos fueron inoculados sumergiéndolos en una suspensión de 5×10^8 conidios/ml durante 15 segundos. También fue evaluado un testigo en Tween 80 (0,05/) sin el hongo. Se realizaron cinco réplicas con 10 adultos cada una para cada aislamiento y para el testigo.

Fue registrado el número de insectos muertos diariamente durante 20 días. Para confirmar la infección fúngica, los insectos muertos fueron colocados en cámaras húmedas e incubados a 26 °C durante 3 días. Se admitió hasta un 10/ mortalidad en los testigos, cuando

superó este valor los ensayos fueron repetidos. Se calcularon los porcentajes de mortalidad para cada aislamiento donde sólo se tuvieron en cuenta los adultos muertos con infección fúngica confirmada y se realizó un promedio entre las cinco réplicas. Cuando el porcentaje de mortalidad fue mayor al 50% fue calculado el tiempo de supervivencia medio (TS₅₀) basándose en la función de distribución de supervivencia de Kaplan - Meier y los intervalos de confianza del 95% considerando la dependencia de los datos (Andersen et al., 1993; Statsdirect, 2008). De acuerdo con los resultados de los bioensayos, aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron preseleccionados cuando el porcentaje de mortalidad fue superior al 90% y los aislamientos no presentaron dificultad para producir los conidios *in vitro* (datos no presentados).

4.2.3. Virulencia sobre adultos de *A. grandis*

Fueron evaluadas las concentraciones letales del 50% y 90% (CL₅₀ y CL₉₀, concentraciones que eliminan el 50% y 90% de la población, respectivamente) de los aislamientos que presentaron mayores mortalidades y menores TS₅₀ en los ensayos de *screening*. Los aislamientos utilizados fueron Ma 2, Ma 7, Ma 20, Ma 36, Ma 49, Ma 50, Bb 23, Bb 286, Bb 301 y Bb 302. Los aislamientos Ma 14 y Ma 35 no fueron utilizados porque, a pesar que produjeron alta mortalidad de adultos en el *screening*, no eran fáciles de producir los conidios para la realización de los bioensayos. Para ello, para cada aislamiento fueron preparadas 6 suspensiones de conidios ajustadas a distintas concentraciones, utilizando una cámara de Neubauer y un contador electrónico. Las concentraciones evaluadas fueron 1x10⁶, 5x10⁶, 1x10⁷, 5x10⁷, 1x10⁸ y 5x10⁸ conidios/ml. Para cada aislamiento se sumergieron los adultos de picudo en las distintas suspensiones siguiendo el protocolo explicado en el Capítulo 2. Fueron realizadas tres réplicas de 40 adultos cada una para cada aislamiento y concentración, y un testigo en Tween 80 (0,05%) sin conidios. Se registró el número de insectos muertos por día durante 15 días. Los insectos muertos fueron separados y colocados en cámaras húmedas a 26 °C para confirmar la muerte por infección fúngica. Los datos fueron analizados utilizando un software específico para el análisis Probit usando el programa Polo Plus®, versión 1.0

(Robertson et al., 2003). El criterio utilizado para determinar las diferencia entre los aislamientos de CL_{50} y CL_{90} de los distintos aislamientos fue la falta de superposición de los intervalos de confianza del 95% (Zhao et al., 1995). A partir de estos ensayos se seleccionaron los aislamientos más virulentos sobre el picudo del algodón, es decir, aquellos que precisan una menor concentración de unidades infectivas para eliminar a la mitad la población de la plaga en estudio.

4.2.4. Efectos subletales

a) Efecto de los hongos entomopatógenos sobre la alimentación

Con el objetivo de evaluar el efecto de la infección en la alimentación, adultos de *A. grandis* recién emergidos fueron sexados según la técnica de Sappington y Spurgeon (2000) mediante la observación del octavo terguito abdominal que en las hembras se encuentra móvil y en los machos es fijo y presenta una muesca (Figura 4.1b). Las hembras fueron separadas, pesadas e inoculadas por el método de inmersión en una suspensión de conidios ajustada a la CL_{50} de los aislamientos virulentos Bb 23 y Ma 20 seleccionados previamente. A pesar que los aislamientos de *B. bassiana*, Bb 301 y Bb 302, presentan menores valores de CL_{50} que Bb23, estos no fueron utilizados, ya que al momento de realizar estos ensayos, aún no habían sido aislados y probadas sus virulencias. Luego de la inoculación, cada hembra fue colocada individualmente en una placa de Petri con un pimpollo de algodón no infectado obtenido de plantas de invernáculo (7-9 mm de diámetro medido en la parte más ancha del pimpollo y con brácteas intactas) (Greenberg et al., 2005). Los pimpollos fueron reemplazados diariamente durante 4 días.

El número de orificios de alimentación en los pimpollos de algodón y el cambio en el peso de las hembras fue registrado a las 24, 48, 72 y 96 h. Se sabe que las hembras de picudo depositan los huevos en orificios que producen al alimentarse y luego los cubren con excrementos y secreciones, donde cada orificio tapado corresponde a un huevo ovipuesto. Por

este motivo, las punciones no tapadas realizadas por las hembras fueron consideradas como punciones de alimentación exclusivamente y utilizadas para su análisis (Figura 4.2) (Everett y Earle, 1964). Luego se mantuvieron los adultos y una vez muertos fue confirmada la infección fúngica. Para cada aislamiento fueron evaluadas 15 hembras. Se realizó un control con el mismo número de hembras en Tween 80 (0,05/) sin conidios. Los datos de punciones de alimentación fueron comparados con el testigo usando ANOVA de medidas repetidas y la ganancia de peso fue analizada a las 96 h utilizando una prueba de t ($p < 0,05$).

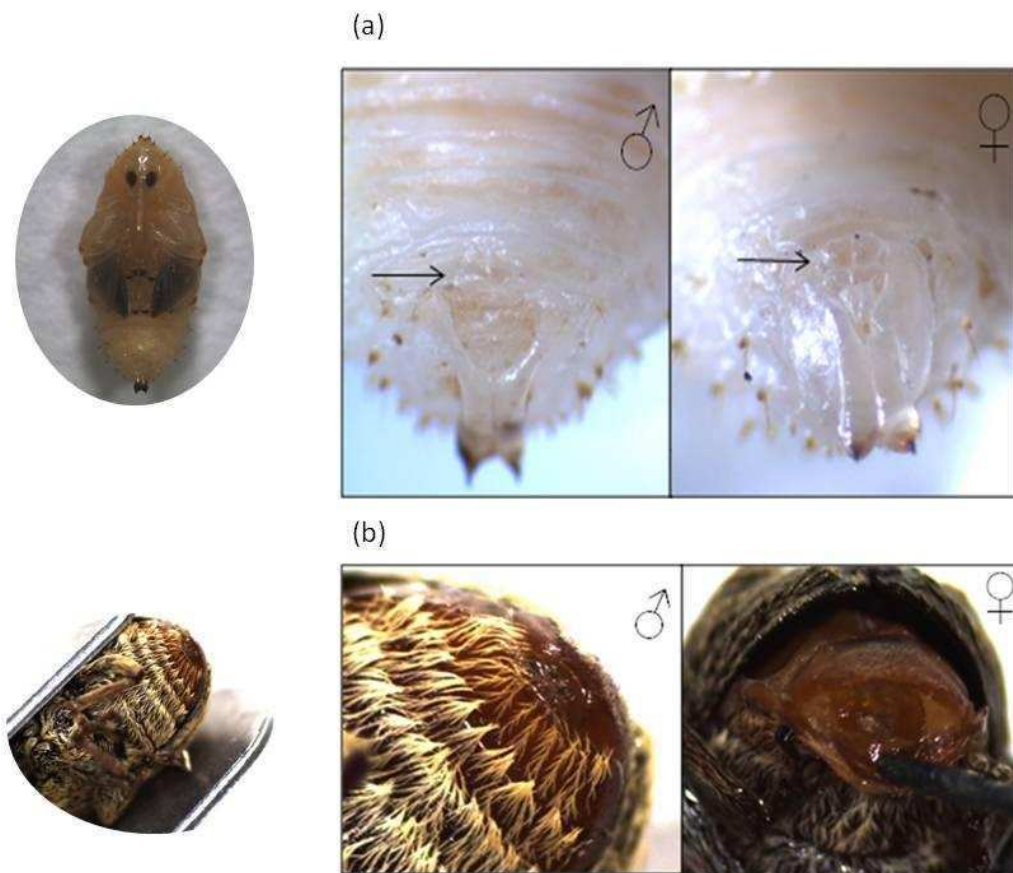


Figura 4.1. Métodos utilizados para sexado de (a) pupas de *A. grandis* según Anderson (1968) y (b) adultos de *A. grandis* según Sappington y Spurgeon (2000)

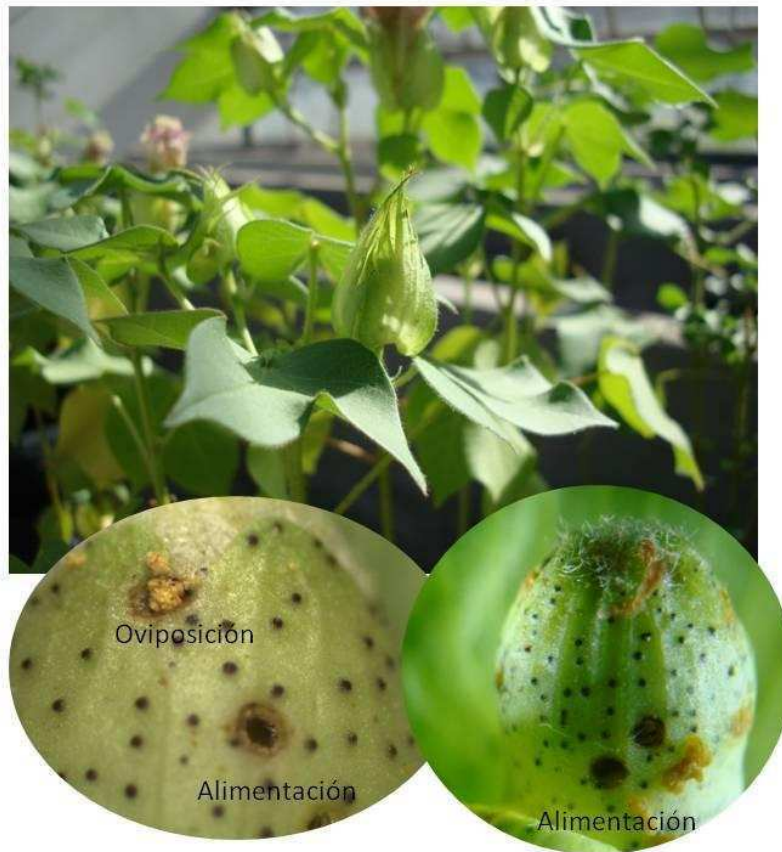


Figura 4.2. Plantas de algodón florecidas y daños de alimentación y oviposición que producen los adultos de *A. grandis* en los pimpollos de algodón.

b) Efectos de los hongos entomopatógenos sobre la oviposición

Se evaluó el efecto de la infección fúngica sobre la fecundidad del picudo del algodnero mediante bioensayos según lo explicado en el Capítulo 2. Para ello, fue determinado el sexo de las pupas de *A. grandis* (Figura 4.1a) y se armaron parejas que se colocaron en envases de plásticos con tapa de 46,5 x 29 mm (diámetro x altura). Una vez emergidos los adultos, las hembras fueron pesadas y las parejas fueron tratadas con una suspensión CL_{50} de conidios del aislamiento Ma 20. Fueron realizados 26 repeticiones (cada pareja) con Ma 20 y 26 testigos sin tratar. Cada hembra fue evaluada en el tiempo, registrándose el número de huevos depositados por día por hembra durante 13 días. El número de huevos ovipuestos por las

hembras testigo y las tratadas con Ma 20 fue comparado mediante un análisis de covarianza donde el peso (mg) fue la covariable. El período de preoviposición de las hembras testigo y las tratadas fue comparado mediante prueba de t (Baverstock et al., 2006). También fue registrado el número de hembras muertas diariamente y confirmada la infección fúngica por cámara húmeda. Además, fueron realizadas algunas disecciones del aparato reproductivo de las hembras tratadas y sin tratar según el método de Bennettova y Fraenkel (1981) y se observaron las diferencias de morfología en el aparato reproductivo de cada tratamiento.

4.3. Resultados

4.3.1. Aislamiento de cepas nativas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Fueron obtenidos 5 aislamientos de *M. anisopliae* (Ma 47, Ma 48, Ma 49, Ma 50, Ma 51) y dos aislamientos de *B. bassiana* (Bb 302, Bb 303) a partir de muestras de suelo (Figura 4.3). Los aislamientos Bb 301 y Bb 316 (*B. bassiana*) fueron obtenidos de cadáveres de *Dyscinetus hydrophiloides* y *A. grandis*, respectivamente. Los aislamientos fueron incluidos en la micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos, y luego utilizados en los bioensayos (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Aislamientos obtenidos de las muestras de suelo y cadáveres momificados.

Especie	Nombre	Fuente	Origen
<i>B. bassiana</i>	Bb 316	<i>A. grandis</i> (Col: Curculionidae)	Las Breñas / Chaco
	Bb 301	<i>D. hydrophiloides</i> (Col: Scarabaeide)	Reconquista / Santa Fe
	Bb 302	Suelo	Las Toscas / Santa Fe
	Bb 303	Suelo	Las Toscas / Santa Fe
<i>M. anisopliae</i>	Ma 47	Suelo	Las Toscas / Santa Fe
	Ma 48	Suelo	Las Toscas / Santa Fe
	Ma 49	Suelo	Las Toscas / Santa Fe
	Ma 50	Suelo	Las Toscas / Santa Fe
	Ma 51	Suelo	Saenz Peña / Chaco

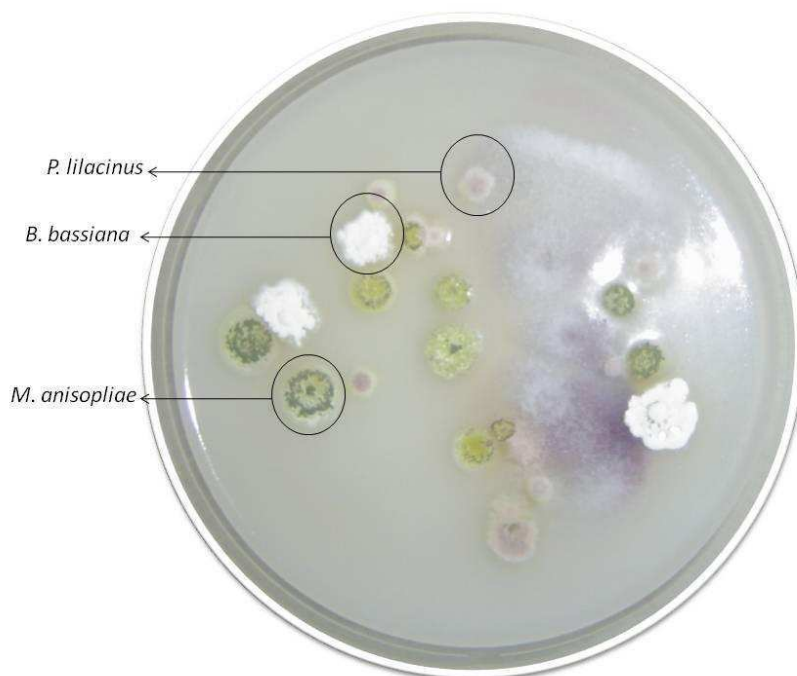


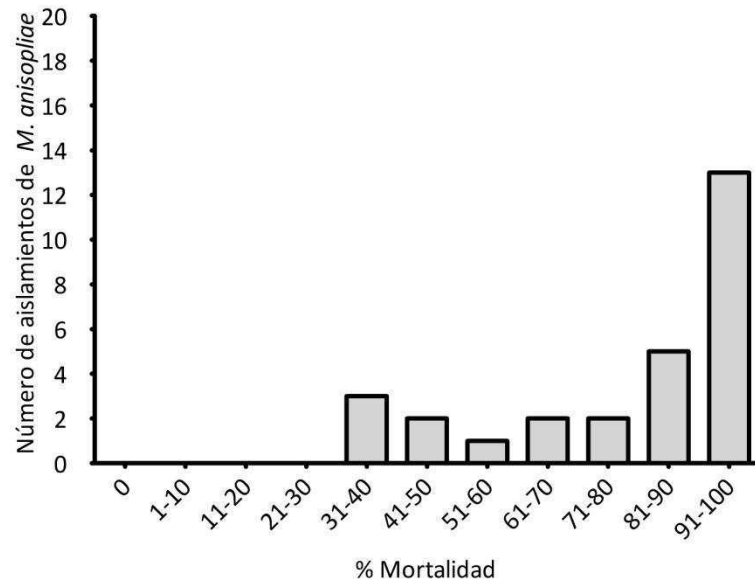
Figura 4.3. Muestra de suelo sembrada e incubada en una placa de Petri con un medio selectivo OA-CTAB donde se diferencian los aislamientos de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* (colonias blancas), *M. anisopliae* (colonias verdes) y *P. lilacinus* (colonias lilas).

4.3.2. Patogenicidad de los aislamientos

Todos los aislamientos de *M. anisopliae* fueron patógenos para el picudo del algodón y se obtuvo entre un 32 y 100% de mortalidad. El 46% de los aislamientos de esta especie causaron más del 90% de mortalidad (Figura 4.4a). Respecto a los aislamientos de *B. bassiana*, la mayoría no fueron patógenos o mostraron baja virulencia (Figura 4.4b). El Anexo 1 detalla el porcentaje promedio de mortalidad (\pm DE) y el TS_{50} (Intervalos de confianza del 95% de Andersen) de adultos de *A. grandis* inoculados por inmersión en una suspensión con 5×10^8 conidios/ml de todos los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* probados y el origen del cual se obtuvieron los mismos.

Basado en los bioensayos, 4 aislamientos de *B. bassiana* (Bb 23, Bb 286, Bb 301, Bb 302) y 6 de *M. anisopliae* (Ma 2, Ma 7, Ma 20, Ma 36, Ma 49, Ma 50) fueron seleccionados (Tabla 4.2). Sin embargo, los aislamientos de *M. anisopliae* produjeron mayores valores de mortalidad en adultos de *A. grandis*, mientras que sólo Bb 301 produjo un 92% de mortalidad. Además, los aislamientos de *M. anisopliae* presentaron menores valores de TS_{50} , que estuvieron entre 4 y 6 días, respecto a *B. bassiana* que fueron de 7 y 9 días. Por último, los aislamientos que resultaron más virulentos fueron obtenidos de fuentes variadas, tanto de suelo como de diferentes órdenes de insectos hospedadores (Tabla 4.2).

(a)



(b)

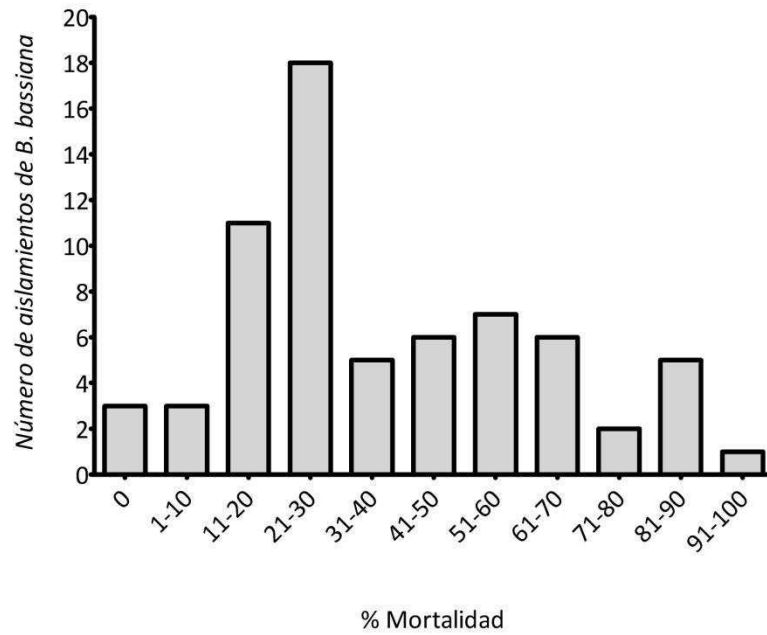


Figura 4.4. Distribución de frecuencias de los porcentajes de mortalidad de adultos del picudo del algodón producido por los distintos aislamientos de (a) *M. anisopliae* y (b) *B. bassiana*.

Tabla 4.2. Porcentaje de mortalidad promedio ($\bar{M} \pm DE$) y tiempo de supervivencia media (TS_{50}) (Intervalo de Confianza del 95% de Andersen (IC_{95})) de adultos de *A. grandis* inoculados con 5×10^8 conidios/ml de los distintos aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* que resultaron virulentos para *A. grandis* y el origen de los aislamientos.

Especie	Aislamiento	\bar{M} (máx-mín)	TS_{50} (IC_{95}) (días)	Origen
<i>M. anisopliae</i>	Ma 2	100 (100)	5,00 (4,87 – 5,13)	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hym.: Formicidae)
	Ma 5	92 (70-100)	5,00 (4,74 – 5,26)	Suelo
	Ma 6	92 (80-100)	6,00 (5,64 – 6,36)	<i>Diloboderus abderus</i> (Col.: Scarabeidae)
	Ma 7	100 (100)	6,00 (5,75 – 6,25)	<i>D. abderus</i>
	Ma 14	98 (90-100)	6,00 (5,66 - 6,34)	<i>A. lundii</i>
	Ma 16	92 (80-100)	5,00 (4,84 – 5,16)	<i>A. lundii</i>
	Ma 17	92 (80-100)	5,00 (4,79 – 5,20)	<i>A. lundii</i>
	Ma 20	100 (100)	6,00 (5,74 – 6,26)	<i>A. lundii</i>
	Ma 31	90 (80-100)	6,00 (5,54 – 6,46)	Suelo
	Ma 35	98 (90-100)	5,00 (4,74 – 5,26)	<i>D. abderus</i>
	Ma 36	94 (90-100)	6,00 (5,48 – 6,52)	Suelo
	Ma 45	90 (80-100)	6,00 (5,24 – 6,76)	Suelo
	Ma 49	98 (90-100)	6,00 (5,70 – 6,30)	Suelo
	Ma 50	100 (100)	4,00 (3,57 – 4,43)	Suelo
<i>B. bassiana</i>	Bb 23	90 (80-100)	7,00 (6,41- 7,59)	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep.: Pyralidae)
	Bb 286	90 (70-100)	8,00 (7,50 – 8,50)	<i>Rhamatocerus pictus</i> (Ort.: Acrididae)
	Bb 301	92 (80-100)	9,00 (8,17 – 9,83)	<i>D. hidrophilides</i> (Col.: Scarabaeide)
	Bb 302	90 (80-100)	7,00 (6,54 – 7,46)	Suelo

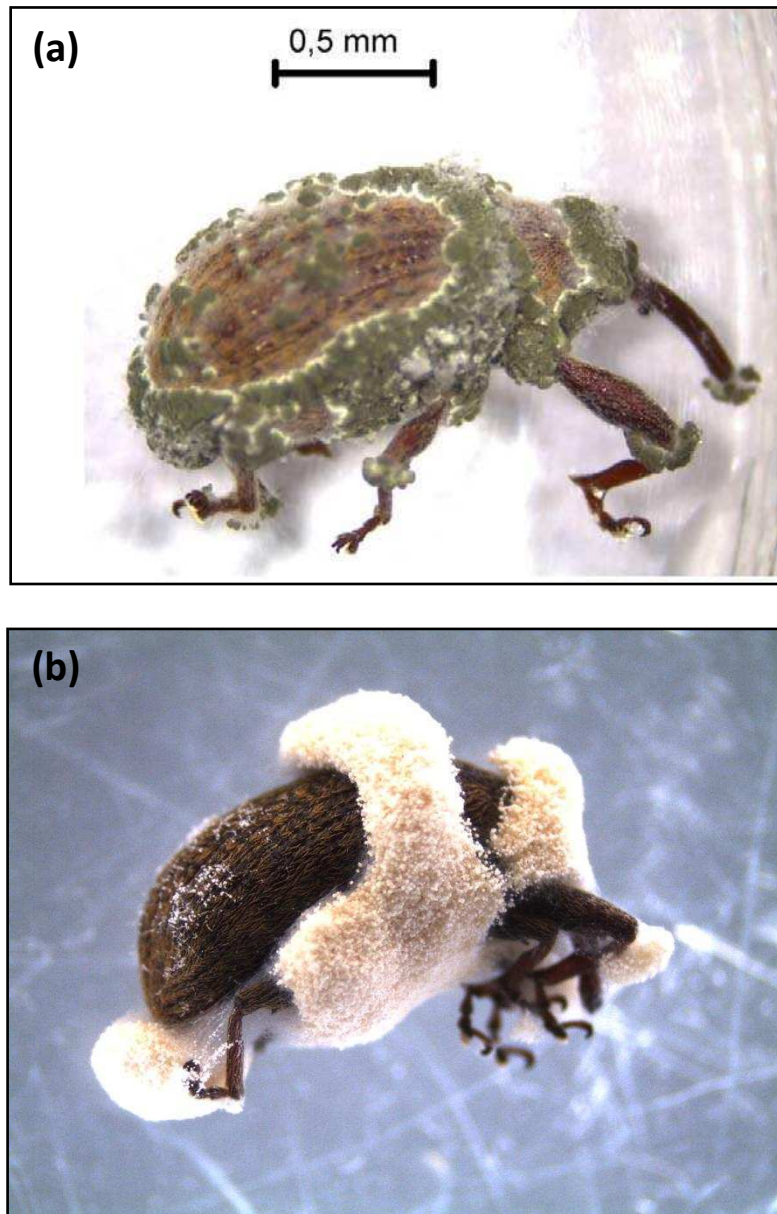


Figura 4.5. Adultos de *A. grandis* con conidios de (a) *M. anisopliae* y de (b) *B. bassiana*.

4.3.3. Concentración letal media de los aislamientos sobre el picudo del algodónero

Los valores de CL_{50} y CL_{90} de los aislamientos preseleccionados se muestran en la Tabla 4.3. Los aislamientos Ma 20 y Ma 50 presentaron los menores valores de CL_{50} y CL_{90} . Se observó nuevamente que los aislamientos de *B. bassiana* fueron menos virulentos que los de *M. anisopliae*. Una menor CL_{50} indica una mayor virulencia del hongo, de manera que se requiere una menor concentración de conidios para eliminar el 50% de la población plaga.

Tabla 4.3. Concentraciones letales 50 y 90 (CL_{50} y CL_{90}); Intervalo de confianza del 95% (IC_{95}); y parámetros de regresión a (ordenada al origen) y b (pendiente) estimados por el método de Probit de los aislamientos probados contra adultos de *A. grandis*.

Aislamiento	CL_{50} (con $\times 10^8 \times ml^{-1}$)	CL_{90} (con $\times 10^8 \times ml^{-1}$)	b	a	χ^2	gl	
Bb 23	0,86 C (0,60 - 1,32)	9,86 B (5,06 - 28,4)	1,17	-4,27	6,26	4	NS
Bb 286	1,45 C (0,94 - 2,53)	21,5 C (9,23 - 91,8)	1,07	-3,72	1,43	3	NS
Bb 301	0,45 BC (0,32 - 0,61)	3,27 B (2,18 - 5,65)	1,30	-4,99	4,72	4	NS
Bb 302	0,48 ABC (0,34 - 0,66)	3,55 B (2,17 - 7,44)	1,44	-6,08	5,10	3	NS
Ma 2	0,35 B (0,24 - 0,55)	3,54 BC (1,79 - 11,0)	1,28	-4,64	0,11	3	NS
Ma 7	0,33 B (0,24 - 0,48)	2,57 B (1,44 - 6,51)	1,27	-4,53	2,15	3	NS
Ma 20	0,12 A (0,09 - 0,16)	0,78 A (0,50 - 1,14)	1,39	-4,81	3,77	3	NS

Ma 36	0,19 AB (0,14 - 0,26)	0,96 AB (0,34 - 1,77)	1,43	-5,28	5,11	3	NS
Ma 49	0,17 AB (0,12 - 0,25)	1,54 AB (0,90 - 3,36)	1,18	-3,47	3,96	3	NS
Ma 50	0,11 A (0,09 - 0,18)	0,94 AB (0,60 - 1,84)	1,40	-4,93	0,98	3	NS

χ^2 indica el ajuste de los datos al modelo de Probit. NS indica un ajuste al modelo (5/) con gl (grados de libertad). Los valores de CL₅₀ seguidos por la misma letra, no muestran diferencias basado en la no superposición de los IC₉₅.

4.3.4. Efecto de la infección fúngica sobre el comportamiento de alimentación

La ganancia de peso (mg) de los picudos fue reducida cuando los mismos fueron inóculados con Ma 20 ($t(32) = 4,01$; $p < 0,0003$) y Bb 23 ($t(28) = 3,17$; $p < 0,004$). El número promedio de orificios de alimentación realizados sobre los pimpollos fue significativamente menor en hembras infectadas respecto a las hembras control a partir de las 72 y 96 h luego del tratamiento con el hongo ($F_{Bb\ 23}(3, 84) = 3,86$; $p < 0,012$; $F_{Ma\ 20}(3, 96) = 3,71$; $p < 0,014$) (Figura 4.6 a y b).

Además, se observó que las hembras testigo comenzaron a oviponer a las 96 h, mientras que las hembras tratadas con hongos entomopatógenos no ovipusieron. Esto podría sugerir una posible inhibición en el comportamiento reproductivo.

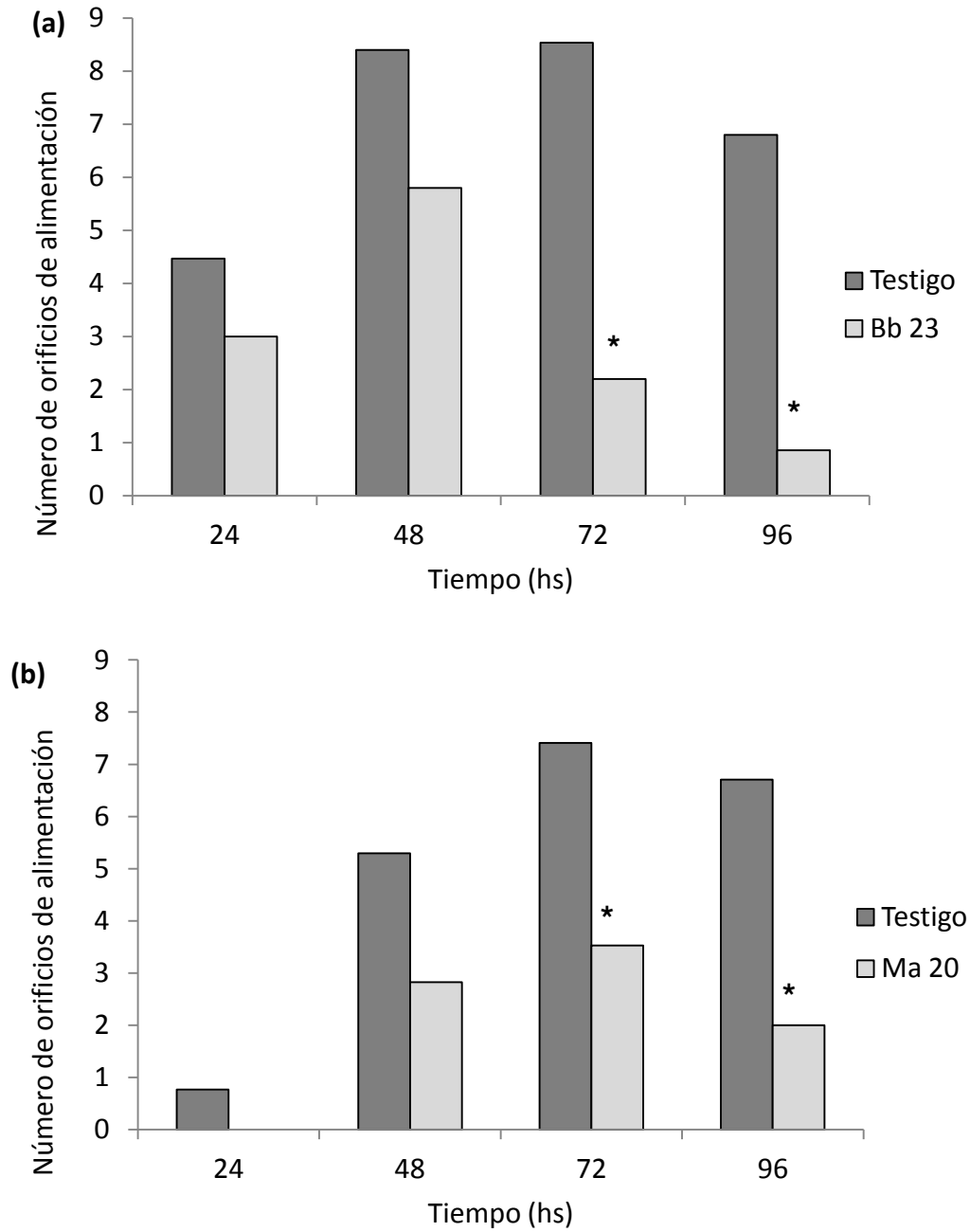


Figura 4.6. Efecto de los aislamientos Bb 23 y Ma 20 sobre el número de orificios de alimentación sobre el pimpollo de algodón. * indica diferencias significativas entre las medias de cada tratamiento en un tiempo determinado (ANOVA de medidas repetidas; $p < 0,001$)

4.3.5. Efecto de los hongos entomopatógenos sobre la oviposición

El período de preoviposición donde no depositaron huevos las hembras testigo ni las tratadas con Ma 20 no presentó diferencias significativas entre los tratamientos (Testigo = $3,46 \pm 0,72$ días; Ma 20 = $3,61 \pm 0,78$ días; $t(45) = -0,7$; $p = 0,5$) (Figura 4.7). Luego de este período, comenzó la oviposición, alcanzando valores máximos entre el día 9 y 12 para las hembras testigo donde el número de huevos depositados por hembra por día fue $17,22 \pm 0,44$ en promedio entre estas fechas. Sin embargo, las hembras tratadas con Ma 20 no alcanzaron este número de oviposiciones diarias, además de registrarse un aumento en la mortalidad a partir del octavo día. El número promedio de oviposiciones por hembra fue mayor en las hembras testigo respecto a las tratadas con Ma 20 (Testigo = $137,38 \pm 46,6$; Ma 20 = $27,81 \pm 46,54$; $F(1,47) = 64,62$; $p < 0,0001$). La mortalidad de las hembras tratadas con la CL_{50} del aislamiento Ma 20 comenzó a partir del día 8 y se registró al final del ensayo 73,08% de mortalidad de estas, mientras que para las hembras testigo fue 3,85%. Todas las hembras muertas al final del ensayo presentaron infección fúngica. El número total de huevos depositados por las hembras testigo fue 3.297 huevos, mientras que las tratadas con Ma 20 pusieron 723 huevos (4,56 veces menos). Por otro lado, se observó que algunos huevos e incluso algunas larvas nacidas a partir de huevos depositados por hembras tratadas con Ma 20 desarrollaron la enfermedad y produjeron conidios de *M. anisopliae* (Figura 4.8 a y b), lo que sugiere que existe una transmisión vertical del hongo.

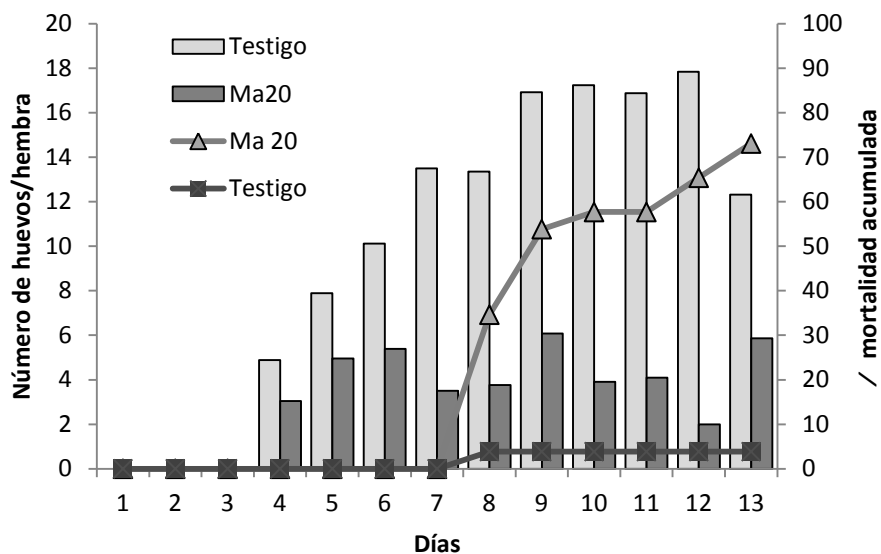


Figura 4.7. Número de huevos por hembra por día (representado por las barras) y porcentaje de mortalidad acumulada (representado por las líneas), de las hembras testigo y tratadas con Ma 20.

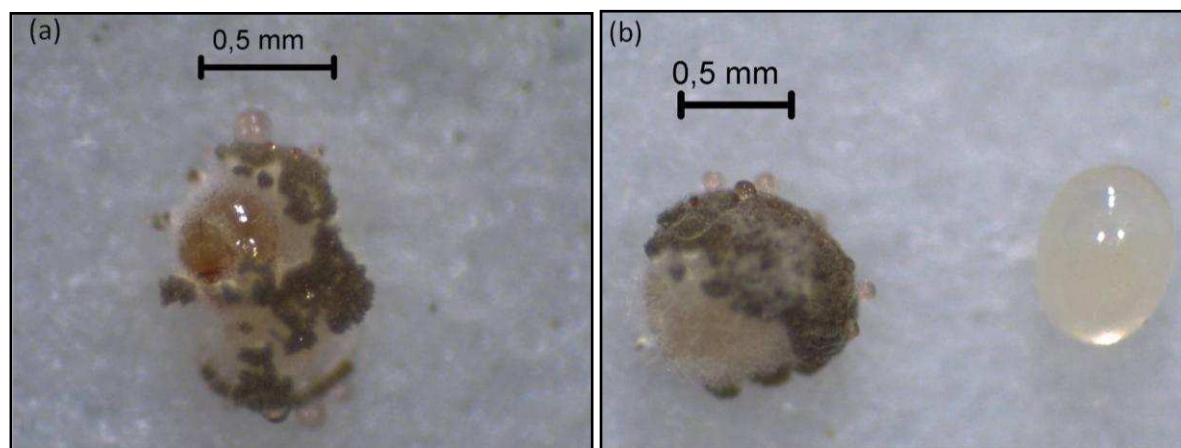


Figura 4.8. Esporulación de Ma 20 (*M. anisopliae*) sobre (a) larva; y (b) huevo nacidos a partir de hembras de *A. grandis* infectadas.

Las disecciones fueron realizadas luego de finalizado el ensayo sobre una hembra tratada con Ma 20 y una hembra testigo (Figura 4.9). Los órganos reproductivos de la hembra poseen un par de ovariolas en cada lado del abdomen, constituyendo un ovario. El tamaño de las

ovariolas varía según la edad y estado reproductivo de la hembra (Burke, 1959). Se encontró que la hembra testigo poseía un desarrollo normal de las ovariolas, mientras que la hembra tratada con Ma 20 mostró atrofia, sin encontrarse oocitos maduros.

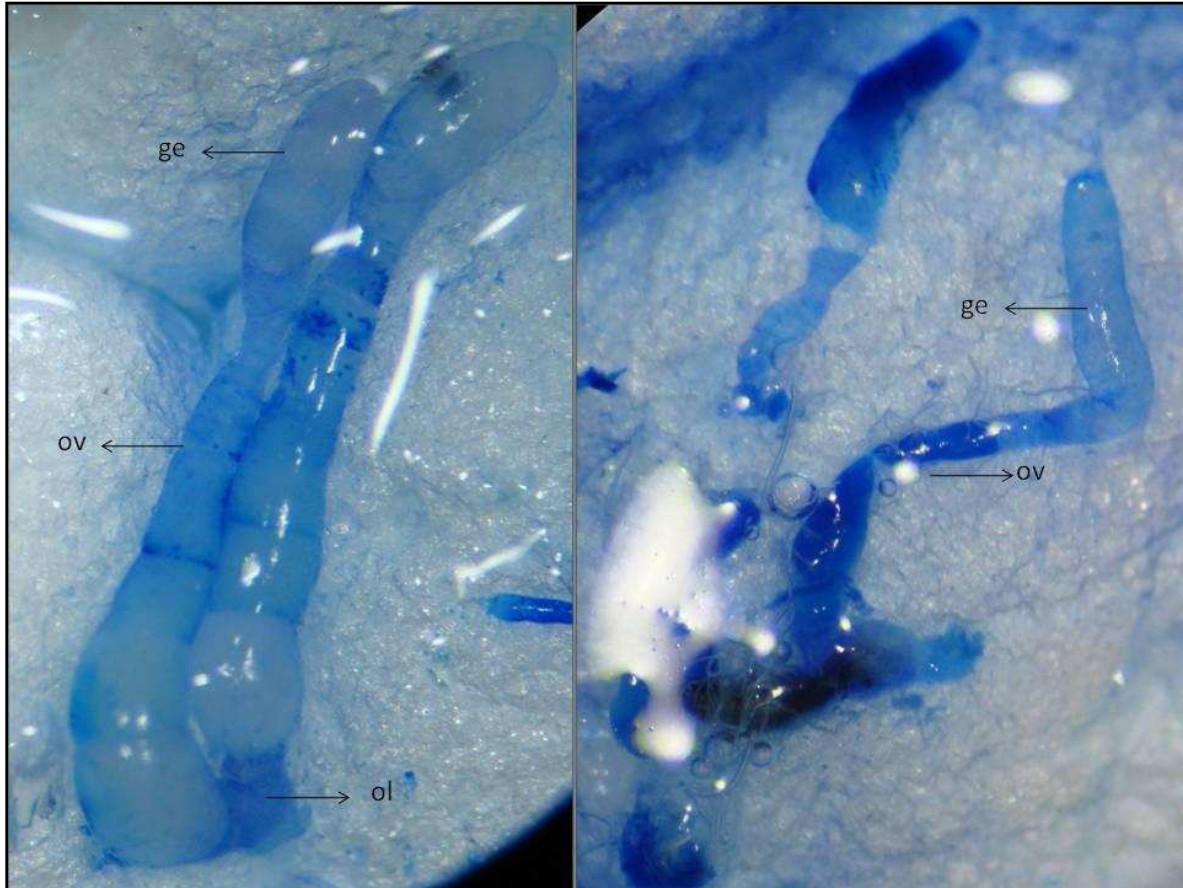


Figura 4.9. Ovario de *A. grandis* disectado a partir de (a) una hembra testigo y (b) una hembra tratada con Ma 20. ge, gemario; ov, ovariola; ol, oviducto lateral.

4.4. Discusión

4.4.1. Patogenicidad y virulencia de los aislamientos sobre *A. grandis*

Se encontró que las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* son patógenas para adultos de *A. grandis*, sin embargo, la capacidad de desarrollar la enfermedad y mortalidad sobre este

insecto varía según el aislamiento y la especie. Silva (2001), probó 12 aislamientos de *B. bassiana* de distintos orígenes inoculando adultos de *A. grandis* con una suspensión de 1×10^8 conidios/ml. El rango de mortalidades que obtuvieron fue 15-83%, donde sólo un aislamiento fue capaz de producir más del 65% de mortalidad y con un tiempo de mortalidad media entre 5 y 11 días, siendo mayor para las cepas menos virulentas. Por otro lado, Giometti et al. (2010) evaluaron 9 aislamientos de *B. bassiana* provenientes de distintos hospederos y distintas regiones geográficas sobre adultos de *A. grandis* recién emergidos inoculados en una suspensión de 1×10^8 conidios/ml. Los aislamientos evaluados por estos autores produjeron entre 50 - 85% de mortalidad con un tiempo de supervivencia media entre 2,3 y 8,66 días. A diferencia de lo presentado en los resultados de esta tesis, todos los aislamientos de *B. bassiana* produjeron alta mortalidad. Estas diferencias pueden deberse a que estos autores utilizaron en los bioensayos adultos de *A. grandis* obtenidos en campo, los cuales muchas veces se encuentran en menor condición nutricional e inclusive con enfermedades, mientras que trabajar con insectos criados en laboratorio minimiza otros factores posibles de mortalidad y además garantiza poder utilizar una población más homogénea. Otros factores que influyen en la virulencia de los aislamientos son la edad de los insectos y el método de exposición al hongo que se utilice, el cual puede ser por inmersión, pulverización, topicación sobre el cuerpo del insecto o tratar pimpollos de algodón y luego colocar a los insectos (Wright y Chandler, 1991).

En este trabajo se encontró que los aislamientos de *M. anisopliae* fueron más virulentos respecto a los de *B. bassiana*. Existen varios trabajos donde se encontraron resultados similares con otros insectos, inclusive de la familia Curculionidae. Gindin et al. (2006) observaron que cepas de *M. anisopliae* fueron más virulentas y que el tiempo letal medio fue menor con respecto a *B. bassiana* sobre larvas del picudo rojo de las palmeras, *R. ferrugineus* (Coleop.: Curculionidae). Dubois et al. (2008) encontraron una mayor virulencia de las cepas de *M. anisopliae* y *B. brongniartii* respecto a otras especies de hongos entomopatógenos sobre adultos de *Anoplophora glabripennis* (Coleop.: Cerambycidae). Quintela y Roberts (1992) observaron una mayor virulencia de aislamientos de *M. anisopliae* respecto a los de *B. bassiana* sobre larvas de *Chalcodermus bimaculatus* (Coleop.: Curculionidae).

Los aislamientos que causaron alta mortalidad en *A. grandis* fueron obtenidos de una amplia variedad de fuentes. En general, el rango de hospedadores descrito en estudios de laboratorio no reflejaría el rango que se encuentra en la naturaleza. El rango biológico de hospedadores es determinado por factores espacio-temporales tanto como por interacciones fisiológicas (Castrillo et al., 2005). Por ejemplo, Fernandes et al. (2011) observaron que varios aislamientos de *B. bassiana* obtenidos de la naturaleza infectando garrapatas, no resultaron significativamente más virulentos contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) respecto a otros aislamientos obtenidos de otro artrópodos huéspedes. Cabe destacar que 4 de los aislamientos que presentaron mayor virulencia (Bb 301, Bb 302, Ma 49 y Ma 50) fueron los obtenidos durante el desarrollo de la tesis.

En base a los resultados obtenidos, fueron seleccionaron los aislamientos Ma 20 y Ma 50, los cuales resultaron más virulentos contra adultos de *A. grandis*.

4.4.2. Efecto de los hongos entomopatógenos sobre la alimentación

Al evaluar el efecto de un aislamiento de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae* sobre la alimentación de los adultos de *A. grandis*, se encontró que a partir de las 72 h disminuye el daño de alimentación producida por los adultos respecto a los insectos sanos. Existen otros trabajos donde se evaluó el comportamiento de alimentación de distintas especies de insectos infectadas con *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp., sin embargo, este efecto no había sido evaluado sobre *A. grandis*. France et al. (2002) evaluó 4 aislamientos nativos de *B. bassiana* sobre el consumo de alimento de adultos de *Asynonychus cervinus* (Coleop.: Curculionidae), y encontraron que la ingesta de alimento en insectos infectados disminuye a través del tiempo hasta la muerte. Ekesi (2001), quien evaluó el efecto de *B. bassiana* sobre la alimentación de *Ootheca mutabilis* (Coleop.: Chrysomelidae), observó que el consumo diario de alimento en insectos tratados fue significativamente menor luego de dos días de la aplicación del

tratamiento respecto a los testigos. Fargues et al. (1994) trabajó con el cuarto estadio larval de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleop.: Chrysomelidae), infectado con *B. bassiana* y encontraron una reducción significativa del consumo de alimento luego de 2 días del tratamiento. Tefera y Pringle (2003) estudiaron el consumo diario de alimento por el barrenador moteado del tallo, *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae), y observaron que este parámetro disminuye luego de 4 y 5 días del tratamiento con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respectivamente, y un aumento en la concentración de conidios resultaba en una mayor reducción del consumo de alimento.

Los hongos entomopatógenos han sido ampliamente criticados debido a que durante el período de infección la plaga continúa alimentándose y realizando daños en el cultivo, sin embargo, los efectos subletales encontrados sobre la alimentación podría en parte contrarrestar el hecho que el tiempo en que mueren los insectos tratados con micoinsecticidas es mayor comparado con los insecticidas convencionales.

4.4.3. Efecto de los hongos entomopatógenos sobre la oviposición

Un hallazgo interesante en este trabajo fue que al tratar hembras de *A. grandis* con Ma 20 la fecundidad disminuyó. Si bien el tiempo de preoviposición no presentó diferencias entre hembras sanas e infectadas con Ma 20, el número de oviposiciones totales por hembra fue 5 veces menor para las hembras infectadas durante los 13 días que fueron evaluadas (Testigo = $137,38 \pm 46,6$; Ma 20 = $27,81 \pm 46,54$). Si se considera que las hembras pueden vivir en promedio $74,24 \pm 31,96$ días y poner en promedio un total de 397 huevos (Capítulo 3), esta diferencia entre el número de oviposiciones por hembras tratadas con Ma 20 y testigo sería mucho mayor. Además, algunos huevos y larvas nacidas de estas hembras estaban infectados con Ma 20, si bien la tasa de transmisión vertical no fue evaluada en este trabajo. Similarmente, Gindin et al. (2006) encontró que hembras tratadas con *B. bassiana* y *M. anisopliae* de *R. ferrugineus* (Coleop.: Curculionidae) disminuyeron el período de oviposición y la fertilidad fue tres veces menor que las hembras testigo. Sin embargo, a diferencia de lo observado en este

trabajo, el promedio de huevos puesto por hembra por día no difirió entre hembras tratadas con *M. anisopliae* y las hembras testigo. Castrillo et al. (2011) estudiaron el efecto de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre la postura de *Xylosandrus germanus* (Coleop.: Scolytidae). Estos autores encontraron que las posturas de las hembras tratadas fueron más pequeñas, y algunas tenían hasta el 100% de la progenie infectada. Similarmente, la fecundidad de hembras de *Serangium japonicum* (Coleop.: Coccinellidae) infectadas con *L. lecanii* disminuye sin afectar el tiempo de preoviposición (Fatiha et al., 2008). En esta tesis, las hembras de *A. grandis* infectadas con Ma 20 sufrieron una disminución en la fecundidad, sugiriendo que los recursos del hospedador fueron utilizados por el patógeno. Por lo contrario, otros trabajos sugieren que los hospedadores pueden mantener o incrementar la producción de huevos en respuesta a estados tempranos de la infección asegurándose que parte de su potencial reproductivo resulte exitoso (Blanford y Thomas, 2001).

Por último, la transmisión es la dispersión de propágulos infectivos de un huésped infectado a un nuevo huésped y puede ocurrir horizontalmente (a menos de una generación) y vertical (entre generaciones) intraespecífica, interespecífica y a escala local de una sola planta o a escala de paisaje (Baverstock et al., 2010). De este modo, la transmisión es un parámetro clave que determina la velocidad de propagación de los hongos entomopatógenos dentro de las poblaciones y, por lo tanto, el potencial del patógeno para su uso como un agente de control microbiano (Steinkraus, 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que puede existir una transmisión vertical del hongo entomopatógeno en *A. grandis*. Este hecho tendría como posible resultado reducir la descendencia de hembras infectadas, disminuyendo el número y daño producido por la plaga, además de aumentar la posibilidad de contagio de la enfermedad a otros picudos en el campo. Sin embargo, estas hipótesis deben ser mejor estudiadas.

Capítulo 5

Características de los aislamientos seleccionados

Nussenbaum, A.L., Angulo Lewylle, M., Lecuona, R.E., 2013. Germination, radial growth and virulence to boll weevil of entomopathogenic fungi at different temperatures. *World Applied Science Journal*. En prensa.

5.1. Introducción

Los hongos entomopatógenos son microorganismos que se emplean como táctica de control de artrópodos plaga en distintos países, tanto como única medida de control como inserto dentro de la estrategia de Manejo Integrado de Plagas (MIP) donde se combinan distintas técnicas de una forma compatible (Shah y Pell, 2003). La aplicación en campo muchas veces es dificultosa debido a que estos hongos, a diferencia de los insecticidas químicos, son organismos vivos, y como tales están influenciados por un gran número de factores, tanto bióticos como abióticos. Entre los primeros se citan las interacciones con microorganismos antagónicos y microbiota del filoplano y, entre los segundos, a la temperatura, irradiación, residuos de agroquímicos y humedad. Estos factores influyen en la supervivencia y la capacidad de causar enfermedad (Inglis et al., 2001; Asi et al., 2010; Jaronski, 2010), por lo cual es importante evaluarlos para analizar cómo afectan la eficiencia de control de estos hongos en el campo y lograr un control exitoso de la plaga.

La temperatura afecta la supervivencia de los conidios y capacidad infectiva del patógeno, tanto como la susceptibilidad, resistencia y supervivencia media de los hospedadores (Roy et al., 2006). El conocimiento del efecto de la temperatura sobre el crecimiento fúngico puede ser considerado como un punto de partida para la selección de cepas adaptadas a ambientes particulares (Vidal et al. 1997; Devi et al. 2005). La radiación solar, en particular los componentes UV-A (320-400nm) y UV-B (280-320 nm), es uno de los factores de mayor mortalidad de conidios y responsable de la corta persistencia de los micoinsecticidas en el campo. Por esta razón, muchos estudios se basan en buscar cepas con alta resistencia natural a esta radiación y evaluar distintos fotoprotectores que puedan ser adicionados en la formulación sin incrementar demasiado los costos del producto final (Jaronski, 2010). Por otro lado, el uso conjunto sobre un mismo cultivo de estos hongos con insecticidas o herbicidas incompatibles puede inhibir el desarrollo y reproducción de los patógenos, no obteniendo el control de la plaga esperado (Hirose et al., 2001).

Otro factor importante que afecta la persistencia de los conidios en el campo es la lluvia. Los conidios aplicados sobre la superficie de las hojas como suspensión acuosa pueden ser lavados fácilmente con las precipitaciones (Inglis et al., 2000). Sin embargo, cuando estos hongos son aplicados en una formulación oleosa o emulsión aceite/agua, la pérdida de conidios es menor (Jackson et al., 2010). Una forma de evitar la pérdida de los conidios causada por la lluvia, es considerar antes de cada aplicación la probabilidad de precipitaciones próxima a la misma.

5.1.1. Compatibilidad con insecticidas químicos

Un importante aspecto del control microbiano de insectos es su integración con el control de plagas utilizando agroquímicos (Neves et al., 2001). Inicialmente, se debe conocer la compatibilidad entre los patógenos con otras prácticas agrícolas debido que el uso de productos químicos incompatibles en conjunto con los hongos entomopatógenos pueden inhibir el desarrollo y reproducción de los patógenos en el campo (Hirose et al., 2001; Jaronski, 2010). La acción de los insecticidas químicos sobre los hongos entomopatógenos puede variar dependiendo de la especie y cepa del patógeno, la naturaleza del producto químico y la dosis utilizada (Alves et al. 1998, Purwar y Sachan, 2006). El conocimiento de la interacción entre los hongos entomopatógenos y los insecticidas químicos es importante para la elección de los productos químicos adecuados a utilizar dentro de programas de MIP.

Una vez que se conoce la compatibilidad entre el insecticida y el hongo, es factible el uso de mezclas hongo - insecticida en el manejo de plagas. En este caso, se deben conocer las interacciones toxicológicas entre ambos. Las interacciones entre dos agentes tóxicos se pueden clasificar de acuerdo al efecto que produce la mezcla sobre el insecto. Un efecto aditivo es cuando la acción conjunta de los compuestos da un efecto total igual al esperado. El efecto sinérgico es cuando la acción conjunta de los compuestos da un efecto total mayor al esperado. La potenciación es un tipo particular de sinergismo, en el que una sustancia que no ejerce

efecto aumenta los efectos de la otra sustancia. Por último, un efecto antagónico es cuando la acción conjunta de una mezcla de compuestos da un efecto total menor al esperado de la mezcla (Kosman y Cohen, 1996). En algunos casos, el uso de productos compatibles asociados con los hongos entomopatógenos podrían incrementar la eficiencia del control (Hirose et al., 2001). En diferentes estudios, *B. bassiana* y *M. anisopliae* han sido probados en combinación con dosis reducidas de insecticidas y se ha encontrado distintos resultados. Si bien, algunos insecticidas pueden inhibir la actividad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* produciendo un efecto antagónico (Ramaraje et al., 1967; Anderson y Roberts, 1983), en otros casos fueron encontrados efectos aditivos y sinérgicos de los hongos entomopatógenos con distintos insecticidas químicos (Quintela y McCoy, 1997; Purwar y Sachan, 2006; Ericsson et al., 2007). Una posible explicación al sinergismo, es que dosis subletales de químicos generan un estrés en la plaga haciéndola más sensible a la acción del patógeno, o de la misma forma, el hongo hace que la plaga sea más susceptible a la acción de los insecticidas químicos (Purwar y Sachan, 2006). En el caso de encontrar efecto aditivo o sinérgico, las mezclas hongo - insecticida podrían reducir significativamente las aplicaciones y la cantidad de insecticida utilizado y minimizar la contaminación tanto como retrasar la expresión de la resistencia de los insectos a los mismos (Anderson y Roberts, 1983).

5.1.2. Efecto de la temperatura

La temperatura es un importante factor que afecta la eficiencia de los hongos entomopatógenos. Para evaluar la capacidad de los hongos en el control de una población plaga, es necesario considerar tanto la virulencia de ese hongo a la especie que se quiere controlar como su *fitness* dentro de las condiciones ambientales en las que se encuentra la misma. El calor y el frío son dos factores abióticos ambientales muy importantes que restringen el uso de los hongos como agentes para el control biológico de insectos. Para un desarrollo exitoso como agentes de control microbiano, los hongos entomopatógenos deben estar adaptados a las condiciones climáticas a las cuales será expuesto, en particular la temperatura

en el lugar en que va a ser empleado (Vidal et al., 1997; Tefera y Pringle, 2003; Li y Feng, 2009). Sin embargo, los conidios del hongo en la naturaleza se encuentran expuestos no sólo a las condiciones macroambientales, sino también a condiciones del microambiente. Un ejemplo es el comportamiento de termorregulación de algunos insectos infectados con patógenos (comúnmente langostas), como una forma de defensa contra el patógeno. Estos elevan la temperatura corporal muchas veces exponiéndose directamente a la radiación solar y de esta forma consiguen eliminar a los microorganismos patógenos (Ouedraogo et al., 1997; Ekesi et al., 1999).

En el laboratorio, la velocidad con que se desarrolla el micelio, y por lo tanto la velocidad en que evoluciona la infección, depende de la temperatura (Samuels et al., 1989). En general, los valores óptimos de crecimiento están entre los 20 y 30 °C (por ejemplo, 25 °C para *B. bassiana*, y 27-28 °C para *M. anisopliae*), pero se encontró una gran variabilidad en la respuesta a la temperatura según la especie y la cepa evaluada (Ferron et al., 1991). Se pueden reconocer tres grupos de cepas de *M. anisopliae* según el comportamiento frente a la temperatura: (1) las capaces de germinar a 5 °C (activos en frío); (2) las capaces de germinar a 37 °C (activos en calor), y (3) las incapaces de germinar a estas temperaturas (mesotérmicos) (Yip et al., 1992).

La mayoría de los cultivos de algodón en la Argentina se encuentran en el norte del país. En esta zona el clima es subtropical y la temperatura alcanza valores muy elevados durante el verano (época donde el cultivo de algodón se encuentra presente). Por ejemplo, en el sudoeste chaqueño, los meses más cálidos, presentan una temperatura media de 28 °C al norte y 27 °C al sur, y los más fríos presentan medias de alrededor de 15,5 °C al norte y 13 °C al sur, siendo las máximas absolutas en el verano 44,8 °C y mínima absoluta en invierno de -7,5 °C para una serie histórica de 70 años (Herrera, 2009). Por este motivo, es importante considerar el rango de temperatura encontrado en los ecosistemas agrícolas en que va a ser utilizado el micoinsecticida, especialmente en la temperatura ambiental extrema en el norte de nuestro país y seleccionar aislamientos capaces de adaptarse a estas condiciones (Ferron et al., 1991; McCammon y Rath, 1994).

Los objetivos de este capítulo fueron:

- i. Estudiar la compatibilidad entre los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* seleccionados con los agroquímicos utilizados para el control del *A. grandis* en el campo.
- ii. Evaluar si existe un efecto sinérgico, aditivo o antagónico entre los insecticidas químicos y los aislamientos seleccionados.
- iii. Determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial y germinación de conidios de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* seleccionados en ensayos *in vitro*.
- iv. Comparar la virulencia de estos aislamientos contra adultos de *A. grandis* a diferentes temperaturas de incubación.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Compatibilidad entre las cepas preseleccionadas y los agroquímicos comúnmente utilizados en cultivos de algodón

La compatibilidad *in vitro* de los aislamientos de *B. bassiana* (Bb 23, Bb 301 y Bb 302) y *M. anisopliae* (Ma 20, Ma 49 y Ma 50) fue estudiada con tres insecticidas comúnmente utilizados para el control del picudo del algodón: dos piretroides, Furia (zetametrina 18/ , FMC Latinoamerica S.A., Argentina) y Atrion (beta-cipermetrina 10/ , Chemotecnica S.A., Argentina), y un organoclorado, Thionex L (endosulfán 35/ , Magan Argentina S.A., Argentina). Los insecticidas fueron seleccionados de la lista de insecticidas aprobados por el SENASA para su utilización en el control del picudo del algodón (Anexo 2). En la tabla 5.1 se presenta una lista de productos químicos utilizados y registrados en la guía de productos fitosanitarios (CASAFE, 2007), la formulación, concentración y las dosis recomendadas para la aplicación en el campo. El procedimiento utilizado que se detalla a continuación fue modificado a partir de Lecuona et al. (2001). Las concentraciones finales del insecticida fueron ajustadas a 10, 50, 100, and 200/ de la dosis recomendada para la aplicación en campo (/ DR) en Tween 80 (0,05/),

dentro de frascos Erlenmeyer (Tabla 5.1). Los conidios de cada aislamiento fueron incorporados a cada frasco de insecticida como 0,2 ml de una suspensión conteniendo 5×10^7 conidios/ml, llegando a un volumen final de 50 ml (Figura 5.1a). Se realizaron tres réplicas (tres Erlenmeyer) por tratamiento, incluido un testigo con los conidios solos, sin insecticida (0/ DR). Las mezclas fueron agitadas a 200 rpm por 16 h a 27 ± 1 °C (Figura 5.1b). Luego de la incubación, se realizaron 3 diluciones seriadas 1:10 de cada mezcla y 0,1 ml de cada dilución y de la suspensión madre fue sembrado en placas de Petri con AMC (para los aislamientos de *B. bassiana*) o APG (para los aislamientos de *M. anisopliae*) e incubados a 27 ± 1 °C. Las UFC fueron contadas luego de tres días, y se calculó el porcentaje de supervivencia (Figura 5.2). Para cada tratamiento, al menos cuatro placas fueron contadas. Todos los tratamientos fueron comparados con el testigo y se calculó el porcentaje de supervivencia de los conidios considerando a las UFC del testigo como el 100%. Los datos de UFC de cada tratamiento fueron comparados mediante ANOVA y prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). En los casos que no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad, se realizó la transformación $x' = (x + 0,5)^{1/2}$.

Tabla 5.1. Productos químicos para el control del picudo del algodón, registrados en la guía de productos fitosanitarios (CASAFE 2007). Nombre del principio activo, tipo de formulación (TF), concentración del producto comercial, dosis recomendada para la aplicación a campo (DR) y nombre comercial del producto.

PRODUCTOS	TF*	CONC.	DR	NOMBRE COMERCIAL
beta-ciflutrina	SC	12,5/	80 – 100 cc/ha	Bulldock Zamba
beta-ciflutrina	EC	5/	200 – 250 cc/ha	Beta Baitroyd 5 EC Zamba
beta-cipermetrina	EC	10/	250 cc/ha	Atrion
ciflutrina	EC	5/	350 - 450 cc/ha	Baytroid 5
deltametrina	EC	5/	200 – 250 cc/ha	Decis 5 EC
deltametrina	EC	5/	200 – 250 cc/ha	Tendal Zamba
deltametrina	SC	5/	200 – 250 cc/ha	Bitam Flow 5 SC

endosulfán	EC	35/	1,5 a 2 litros/ha	Varias marcas
metidati3n	EC	40/	250 cc/ha	Supracid
metidati3n	WP	40/	750 g/ha	Supracid 40 WP
zetametrina	EC	18/	170-220 cc/ha	Furia
zetametrina	EC	40/	80-100 cc/ha	Furia 40 EC
cipermetrina	EC	25/	250-350 cc/ha	Varias marcas

*Tipo de Formulaci3n: SC = suspensiones concentradas, EC = l3quidos emulsionables, WP = polvos mojables.

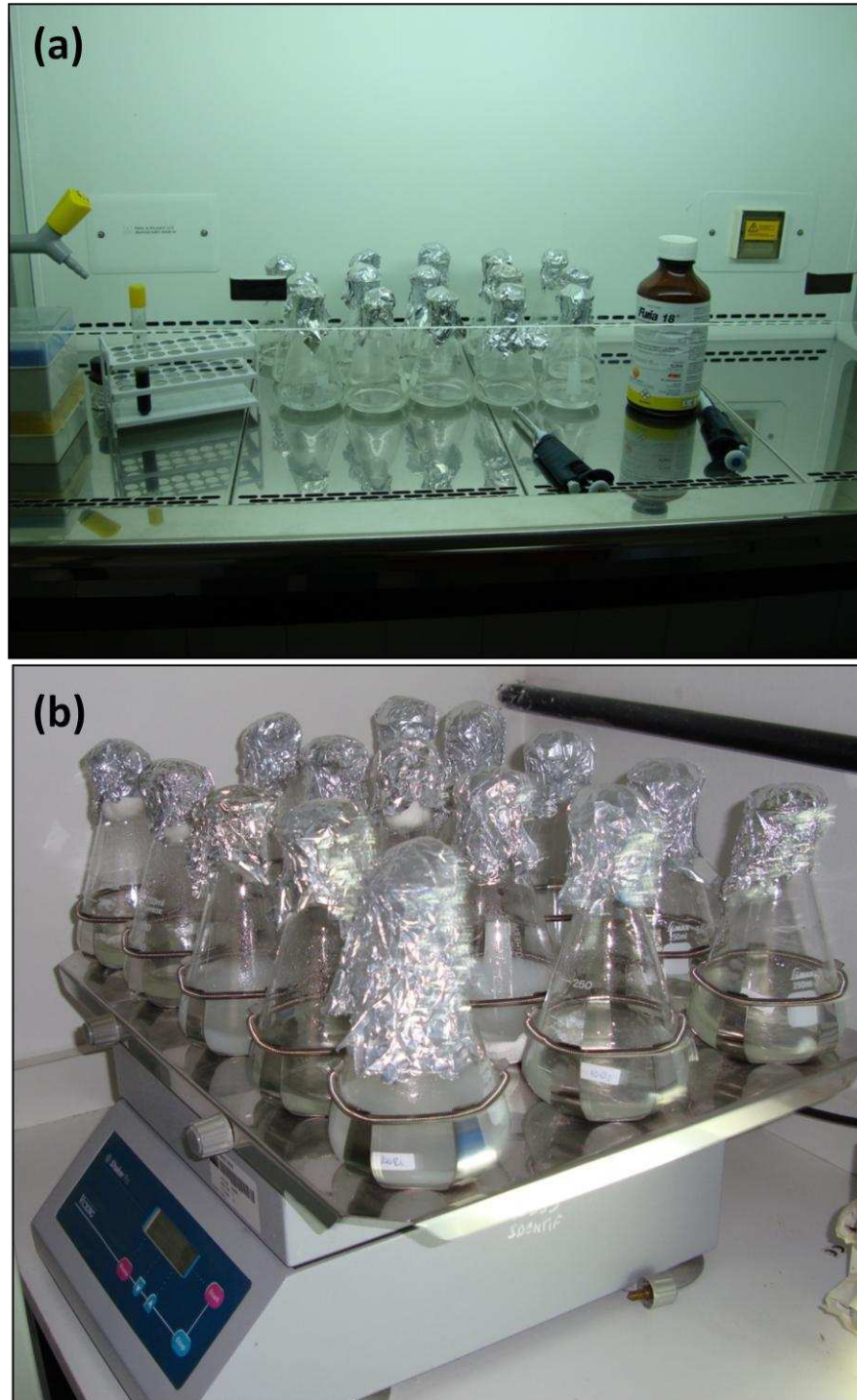


Figura 5.1. (a) Puesta en contacto de los conidios con el insecticida dentro del flujo laminar; (b) Incubación de los Erlenmeyer en agitación a 200 rpm y 27 °C.

Bioensayos de compatibilidad

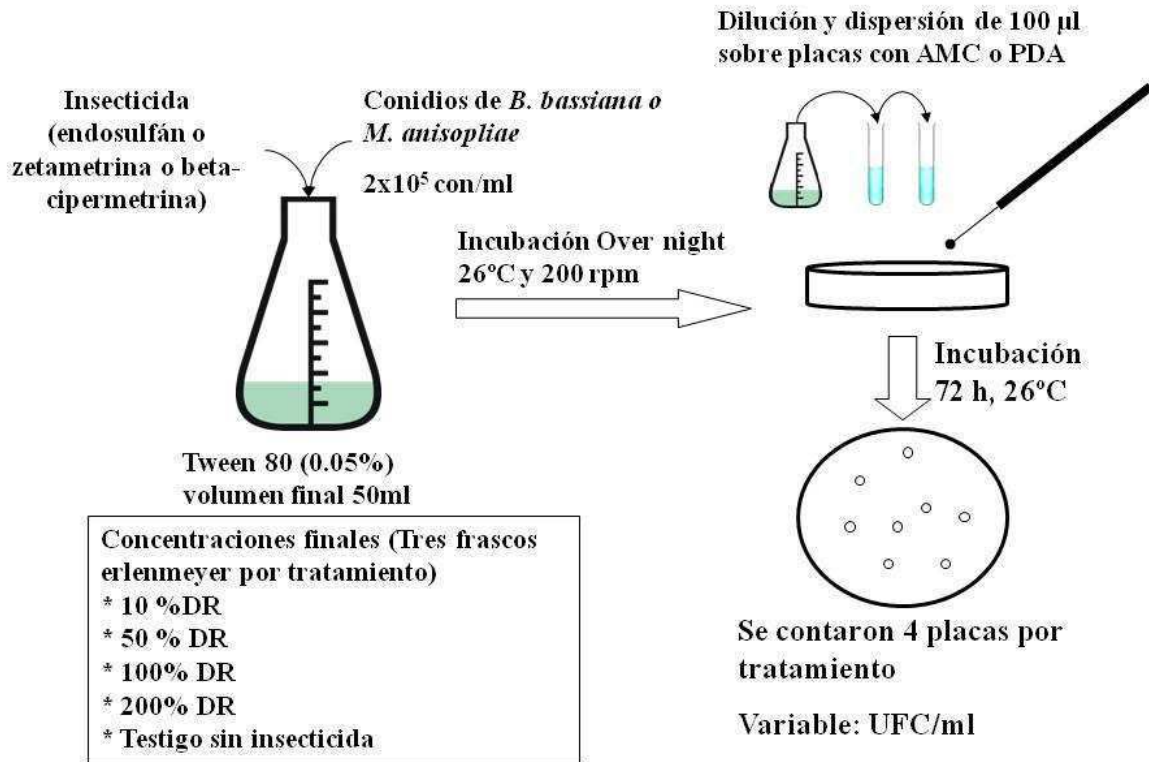


Figura 5.2. Método utilizado para los bioensayos de compatibilidad.

5.2.2. Interacción toxicológica hongo-insecticida sobre adultos de *A. grandis*

Se evaluó el efecto conjunto de uno de los insecticidas químicos utilizados en la sección anterior, Furia (zetametrina 18/) y el aislamiento Ma 20. Se utilizó este aislamiento debido a que es el que mayor virulencia presenta de los aislamientos compatibles con los insecticidas según el ensayo anterior y los resultados obtenidos en el Capítulo 4. Los bioensayos fueron realizados inoculando adultos de *A. grandis* mediante el método de inmersión como fue explicado previamente (Capítulo 2). Se utilizó un modelo al azar factorial donde se probaron tres concentraciones del insecticida (10/ , 50/ y 100/ DR) con dos concentraciones letales de Ma 20 (CL₅₀ y CL₉₀) calculadas anteriormente (Capítulo 4). El testigo fue realizado en Tween 80

(0,05/) sin conidios ni insecticida (sin conidios x 0/ DR). Se realizaron 3 repeticiones de 20 adultos de *A. grandis* para cada uno de los tratamientos y para el testigo.

La primera manifestación de la intoxicación con piretroides en el insecto es la parálisis del tercer par de patas, seguida por temblores y otros efectos de incoordinación al caminar. Los piretroides no producen una muerte rápida, sino que se caracterizan por producir un efecto de “volteo” o *knockdown*: el insecto recostado sobre su dorso no puede volver a su posición normal, es una parálisis muy rápida y reversible. Los insectos pueden permanecer volteados varias horas o días (según la dosis y la especie) y luego se recuperan (Alzogaray y Zerba, 1997). Por este motivo, se registró el número de adultos volteados por el insecticida a las 24h luego del inicio del ensayo y el número de adultos muertos luego de 15 días.

Los insectos muertos al final del ensayo fueron colocados en cámaras húmedas para confirmar la infección por Ma 20. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de dos factores (/ DR x CL) y pruebas a posteriori de Tukey ($p < 0,05$).

5.2.3. Efecto de la temperatura sobre los aislamientos

Se evaluó el efecto *in vitro* de la temperatura sobre el crecimiento radial y germinación de conidios de los aislamientos de *B. bassiana* o *M. anisopliae* más virulentos contra *A. grandis* seleccionados en el Capítulo 4. Los aislamientos evaluados fueron Bb 23, Bb 301, Ma 20 y Ma 50. Estos aislamientos fueron utilizados debido a que son los que presentaron mayor virulencia y resultaron compatibles con los insecticidas según el ensayo anterior y los resultados obtenidos en el Capítulo 4. El aislamiento Bb 23 fue utilizado porque es el que se encontraba en proceso de formulación por la empresa Biagro S.A. en ese momento.

Para los aislamientos de *B. bassiana* (Bb 23, Bb 301) los conidios fueron obtenidos raspando la superficie de las placas de Petri de menos de 15 días de incubación. En el caso de

los aislamientos de *M. anisopliae* (Ma 20, Ma 50), los conidios fueron obtenidos mediante producción en bolsas de arroz (Bahense et al., 2006). Las concentraciones de las suspensiones realizadas fueron cuantificadas utilizando una cámara de Neubauer y la viabilidad de los conidios fue evaluada mediante la prueba de germinación (> 95/) antes de los experimentos (Wraight et al., 2007).

a) Efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial

Para evaluar el crecimiento radial del micelio, se inocularon placas de Petri con medio de cultivo con suspensiones de conidios con una concentración de 10^5 conidios/ml. Sobre la superficie de cada placa fue colocada una gota en el centro utilizando un ansa calibrada de 5 μ l. El diámetro del inoculo inicial resultante fue 4 mm. Las placas fueron incubadas a 23, 27, 30, 35 y 38 °C y oscuridad. Fueron realizadas 6 réplicas (placas) por tratamiento (aislamiento x temperatura). El crecimiento de la colonia a cada temperatura fue registrado midiendo el diámetro (mm) de la colonia en dos líneas perpendiculares previamente marcadas (Figura 5.3). El diámetro de la colonia se registró diariamente durante la primera semana y luego algunos datos fueron colectados hasta 15 días luego de la inoculación.

Los datos de diámetro de las colonias medidos (entre el 3° al 14° día) fueron ajustados a una regresión lineal, donde la pendiente de la recta representa la tasa de crecimiento radial (TCR; mm/día) (Fargues et al., 1992; Vidal et al., 1997). Este parámetro fue utilizado para evaluar la influencia de la temperatura en el crecimiento radial. La TCR por aislamiento y por temperatura fue expresada como la tasa media de las seis réplicas.

Las TCR (pendientes) fueron analizadas mediante ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey ($p < 0,05$).

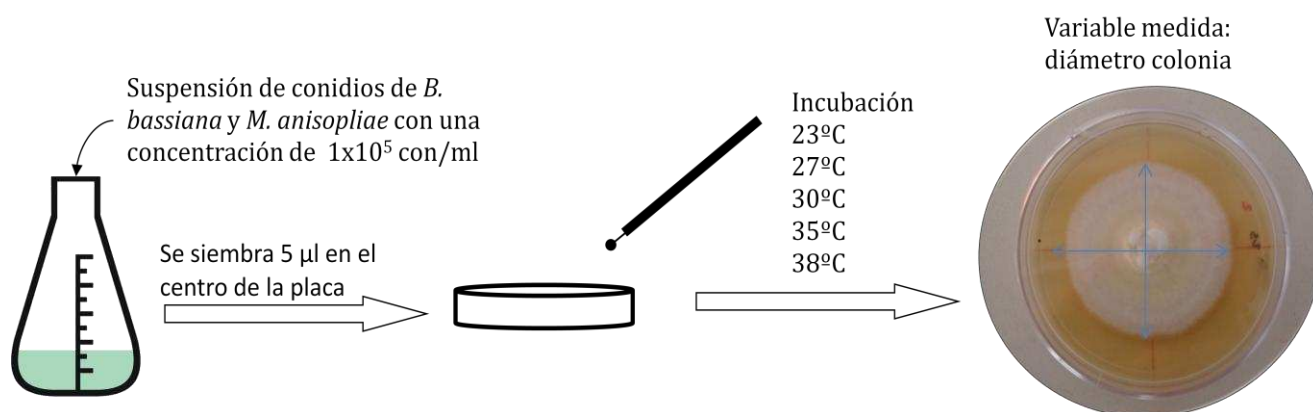


Figura 5.3: Diagrama del método utilizado para evaluar el crecimiento radial de las colonias de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el tiempo y a distintas temperaturas de incubación.

b) Efecto de la temperatura sobre la germinación de los conidios

Con el objetivo de evaluar la germinación de conidios de los aislamientos a distintas temperaturas de incubación, las suspensiones fueron ajustadas a 2×10^7 conidios/ml mediante el recuento en cámara de Neubauer. Alícuotas de 100 µl de las suspensiones fueron sembradas y dispersadas sobre la superficie de placas de Petri conteniendo AMC (para *B. bassiana*) o APG (para *M. anisopliae*) adicionado con 0,002/ (p/v) del antifúngico Benomyl. El Benomyl utilizado es un polvo formulado con 25/ de ingrediente activo (Punch Química SA, Argentina). Una baja concentración de este compuesto adicionado en el medio permite monitorear la germinación de los conidios por largos períodos debido a que inhibe la extensión del tubo germinativo sin afectar negativamente a la germinación (Milner et al., 1991; Braga et al., 2001).

Las placas fueron incubadas a 23, 27, 30 y 35 °C durante 24 h. Luego de la incubación, sobre el medio de cultivo se colocaron cuatro gotas de azul de algodón en lactofenol (Sigma, EEUU) en distintos lugares y un cubre sobre cada una de las gotas. Los conidios en estos campos fueron observados con microscopio óptico a 400x. Se revisaron cuatro campos distintos por placa, cada uno conteniendo como mínimo 100 conidios y fue contado el número de conidios germinados y no germinados. Se calculó el porcentaje de germinación por cada placa

como un promedio por placa. Se realizaron 4 réplicas (o placas) por temperatura y por aislamiento. El porcentaje de germinación de conidios por temperatura para cada aislamiento, fue comparado mediante ANOVA y comparaciones *a posteriori* por prueba de Tukey ($p < 0,05$) para ello los datos fueron transformados a $x' = \arcsen ((x/100)^{1/2})$.

c) Efecto de la temperatura sobre la virulencia

Para los bioensayos se utilizaron adultos de *A. grandis* de la cría de laboratorio y de 24 h de edad, los cuales fueron alimentados previamente con dieta sin anticontaminante según lo explicado en el Capítulo 2.

Los adultos fueron sumergidos dentro de una suspensión de conidios de los aislamientos en Tween 80 (0,05%) con una concentración de 5×10^8 conidios/ml. Los testigos fueron realizados en Tween 80 (0,05%) sin conidios. Una vez inoculados, los insectos fueron incubados en cámaras con humedad y temperatura controladas. Las temperaturas de incubación fueron 27, 30 y 35 °C y 50% HR. La humedad fue mantenida en las cámaras a mayor temperatura colocando recipiente con agua y medida con un higrómetro dos veces al día. Se realizaron tres réplicas por tratamiento (aislamiento y temperatura) y tres réplicas por testigo a cada temperatura. Cada réplica fue de 20 adultos de *A. grandis*. Se registró la mortalidad diariamente a partir del sexto día hasta el día 20 luego de la inoculación. Los insectos muertos fueron puestos en cámaras húmedas para confirmar la infección fúngica.

Se calcularon los porcentajes de mortalidad en cada tratamiento y fueron comparados mediante ANOVA de dos factores y prueba de Tukey ($p < 0,05$). Cuando el porcentaje de mortalidad de los adultos de cada tratamiento fue mayor al 50% fue calculado el tiempo de supervivencia media (TS_{50}) para ello se utilizó la curva de supervivencia de Kaplan – Meier y el intervalo de confianza del 95% teniendo en cuenta la no independencia de los datos (Andersen et al., 1993; Statsdirect, 2008).

5.3. Resultados

5.3.1. Compatibilidad de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* con insecticidas

El efecto de los insecticidas sobre los conidios fue variable dependiendo del aislamiento y el ingrediente activo del insecticida. En general, los aislamientos de *M. anisopliae* mostraron mayor compatibilidad de los conidios con los distintos insecticidas, sin embargo con altas dosis de insecticidas el efecto sobre los conidios de todos los aislamientos fue negativo (Tablas 5.2, 5.3 y 5.4).

Thionex (endosulfán 35%) fue el insecticida más perjudicial para los aislamientos evaluados. Con el 10% DR Bb 23 no creció, mientras que el Bb 301 disminuyó la supervivencia de los conidios al 9,48%. Ningún aislamiento de *B. bassiana*, ni el aislamiento Ma 50 crecieron con 50% DR, mientras que los aislamientos Ma 20 y Ma 49 fueron capaces de crecer presentando una reducción de viabilidad de los conidios con esta dosis (13 y 32% de supervivencia de conidios, respectivamente). Con el 100% DR se observó una fuerte disminución de la supervivencia de los conidios para los aislamientos Ma 20 y Ma 49. Finalmente ninguno de los aislamientos logró crecer con el 200% DR (Tabla 5.2, Figura 5.4).

Tabla 5.2: Unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de seis aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* tratados con cinco concentraciones del insecticida Thionex (DR: Dosis recomendada por el marbete del producto).

Thionex (endosulfán 35/)						
Aislamiento	Bb 23	Bb 301	Bb 302	Ma 20	Ma 49	Ma 50
/ DR	UFC (conidios x 10 ⁵ / ml)					
0	1,45 A	2,42 A	2,1 A	1,19 A	2,59 A	1,73 A
10	0,00 B	0,23 B	1,08 B	0,71 B	2,06 A	0,94 A
50	0,00 B	0,00 C	0,00 C	0,15 C	0,82 B	0,00 B
100	0,00 B	0,00 C	0,00 C	0,11 C	0,23 C	0,00 B
200	0,00 B	0,00 C	0,00 C	0,01 D	0,08 D	0,00 B

* Para cada insecticida, las medias seguidas por la misma letra indican que no hay diferencias significativas entre columnas (prueba de Tukey, p < 0,05).

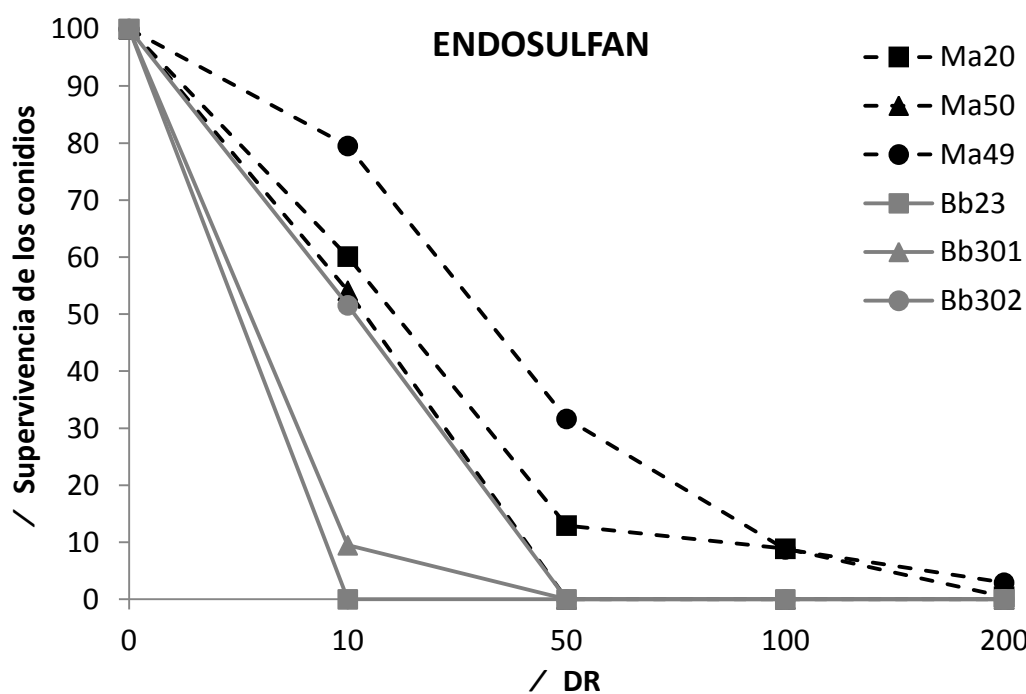


Figura 5.4. Porcentaje de supervivencia de conidios con distintas concentraciones de insecticida.

Con el 10/ DR de Furia (zetametrina 18/), todos los aislamientos tuvieron una supervivencia de conidios por encima del 80/ , y para los aislamientos Bb 23 y Bb 301 el 100/ de los conidios sobrevivió. Ma 50, Bb 23 y Bb 301 tuvieron una supervivencia de conidios por debajo del 24/ con el 50/ DR, mientras que Ma 20 y Bb 302 presentaron supervivencia de conidios cercana al 50/ y Ma 49 mayor al 50/ (61,6/). Los aislamientos de *B. bassiana* no crecieron con el 100/ y 200/ DR. Por otro lado, Ma 49 y Ma 20 presentaron una viabilidad de conidios mayor al 50/ con el 10/ DR, y fueron compatibles con el 200/ DR. Finalmente, los aislamientos que presentaron mayor compatibilidad a este insecticida fueron Ma 20 y Ma 49 (Tabla 5.3, Figura 5.5).

Tabla 5.3. Unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de seis aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* tratados con cinco concentraciones del insecticida Furia (DR: Dosis recomendada por el marbete del producto).

Furia (zetametrina 18/)						
Aislamiento	Bb 23	Bb 301	Bb 302	Ma 20	Ma 49	Ma 50
/ DR	UFC (conidios x 10 ⁵ / ml)					
0	1,83 A ^a	2,46 A	2,64 A	4,58 A	2,86 A	1,42 A
10	1,90 A	2,20 A	3,05 A	3,95 A	2,58 AB	1,13 A
50	0,40 B	4,41 B	1,26 B	2,04 BC	1,76 BC	0,34 B
100	0,00 C	0,00 B	0,001 C	2,70 B	1,44 C	0,10 C
200	0,00 C	0,00 B	0,00 C	1,78 C	1,27 C	0,003 D

* Para cada insecticida, las medias seguidas por la misma letra indican que no hay diferencias significativas entre columnas (prueba de Tukey, p < 0,05).

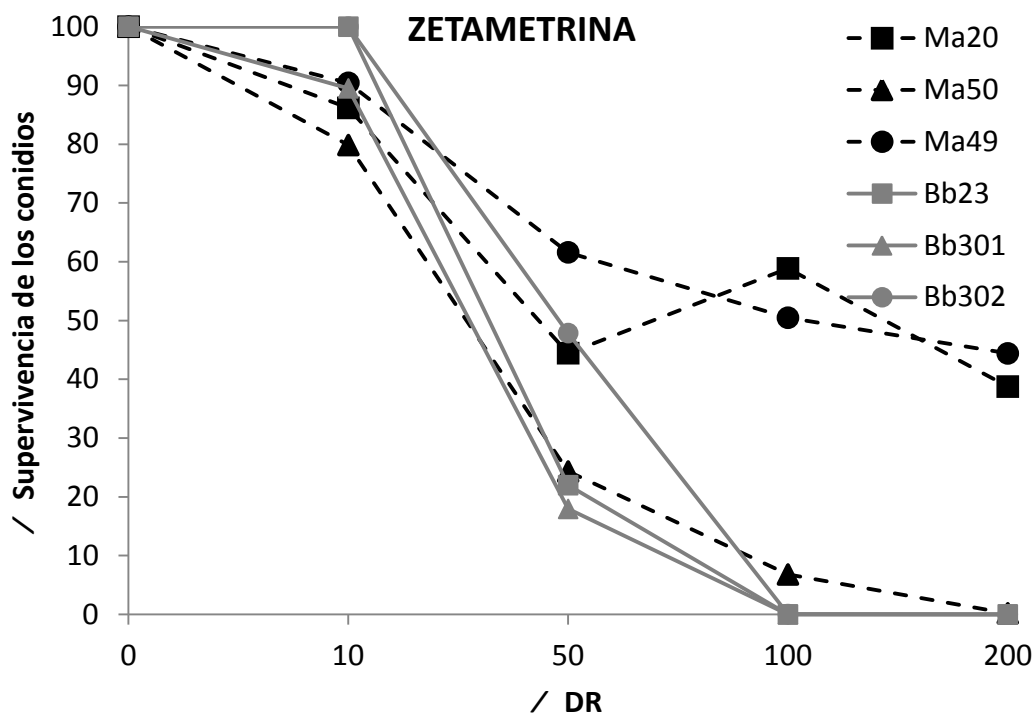


Figura 5.5. Porcentaje de supervivencia de conidios con distintas concentraciones de insecticida.

Por último, Atrion (beta-cipermetrina 10/) fue el insecticida que mostró mayor compatibilidad con ambas especies fúngicas, *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Con el 10/ DR del insecticida todos los aislamientos tuvieron una supervivencia de conidios mayor al 90/ , con excepción de Ma 20 donde el porcentaje de supervivencia de conidios fue 74/ . Al tratar con el 50/ DR, el aislamiento Bb 302 sufrió una fuerte reducción de conidios viables (sólo el 20/ de supervivencia de los conidios), mientras que para el resto de los aislamientos la supervivencia de conidios fue mayor a 58/ . Con el 100/ DR, los aislamientos de *B. bassiana* mostraron baja compatibilidad (sólo para Bb 23 se obtuvieron UFC), mientras que de los aislamientos de *M. anisopliae* el que presentó mayor resistencia fue Ma 49 (82/ supervivencia de conidios). Por último, todos los aislamientos de *M. anisopliae* lograron crecer con una fuerte reducción de los conidios y los de *B. bassiana* no crecieron. Este insecticida fue menos tóxico para los aislamientos de *M. anisopliae* con el 100/ DR (Tabla 5.4, Figura 5.6).

Tabla 5.4. Unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de seis aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* tratados con cinco concentraciones del insecticida Atrion (DR: Dosis recomendada por el marbete del producto).

Atrion (beta-cipermetrina 10/)						
Aislamiento	Bb 23	Bb 301	Bb 302	Ma 20	Ma 49	Ma 50
/ DR	UFC (conidios x 10 ⁵ / ml)					
0	1,89 A	2,54 A	2,67 A	1,78 A	2,50 A	1,60 A
10	1,75 AB	2,33 A	2,38 A	1,32 AB	2,37 A	2,00 A
50	1,18 B	1,73 A	0,54 B	1,03 BC	2,00 A	1,22 AB
100	0,15 C	0,03 B	0,00 C	0,47 CD	1,55 A	0,74 B
200	0,00 D	0,00 B	0,00 C	0,16 D	0,17 B	0,01 C

* Para cada insecticida, las medias seguidas por la misma letra indican que no hay diferencias significativas entre columnas (prueba de Tukey, p < 0,05).

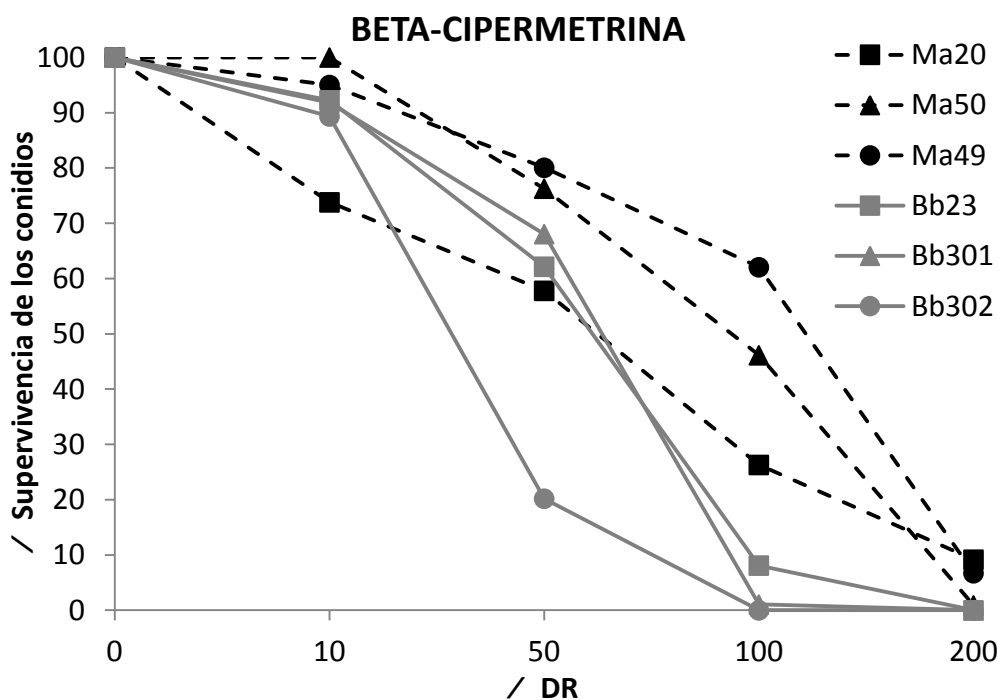


Figura 5.6. Porcentaje de supervivencia de conidios con distintas concentraciones de insecticida.

En resumen, los aislamientos Ma 20 y Ma 49 fueron los más compatibles con los insecticidas Thionex y Furia, mientras que el aislamiento Ma 49 fue el que presentó mayor compatibilidad con el insecticida Atrion. Todos los aislamientos de *B. bassiana* fueron muy susceptibles a los insecticidas probados, debido a que con el 100% DR de los insecticidas ninguno de estos aislamientos fueron capaces de crecer.

5.3.2. Bioensayos hongo – insecticida

A las 24 h el número de adultos volteados en cada tratamiento mostró una interacción positiva entre las concentraciones del insecticida (% DR) y de los conidios (CL) ($F_{\%DR \times CL}(6,24) = 17,08$; $p < 0,001$, Figura 5.7). Por este motivo fueron estudiados los efectos simples (concentración de insecticida x concentración de conidios). Se encontró que al utilizar el insecticida únicamente (sin Ma 20), el porcentaje de volteo aumentó a medida que aumenta el % DR. Con 0 y 10% DR no se observó volteo, con 50% DR un 70% de los individuos estaban volteados, mientras que con el 100% DR se observó el 92% de volteo. Al utilizar el hongo en una concentración CL_{50} y el 50% DR se llegó a un 96% de volteo y este porcentaje fue mayor que al utilizar solamente el 100% DR del insecticida. Por último, al utilizar el hongo en una concentración de CL_{90} , se observó el 100% de volteo con el 50 y 100% DR del insecticida (Figura 5.7, Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Número promedio de adultos volteados en cada tratamiento (\pm DE) a las 24 h del bioensayo con distintas dosis de Ma 20 (sin conidios, CL₅₀ y CL₉₀) y distintas dosis del insecticida Furia (0, 10, 50 y 100/ DR).

/ DR	Sin conidios	CL ₅₀	CL ₉₀	
0/	0 A	0 A	0 A	----
10/	0,67 (1,15) A,a	1,00 (1,00) A,b	4,33 (1,15) B,b	F(2,6)= 10,1, p<0,01
50/	14,00 (1,00) B,a	19,33 (0,58) B,b	20,00 (0) C,b	F(2,6)= 73, p<0,001
100/	18,33 (0,58) C,a	20,00 (0) B,b	20,00 (0) C,b	F(2,6)= 25, p<0,001
	F(3,8)= 390 p<0,001	F(3,8)= 1104 p<0,001	F(3,8)= 982 p<0,001	

*Las medias seguidas por igual letra mayúscula indica diferencias no significativas entre las columnas, mientras que las medias seguidas por la misma letra minúscula indican diferencias no significativas entre las filas (prueba de Tukey, $p < 0,05$).

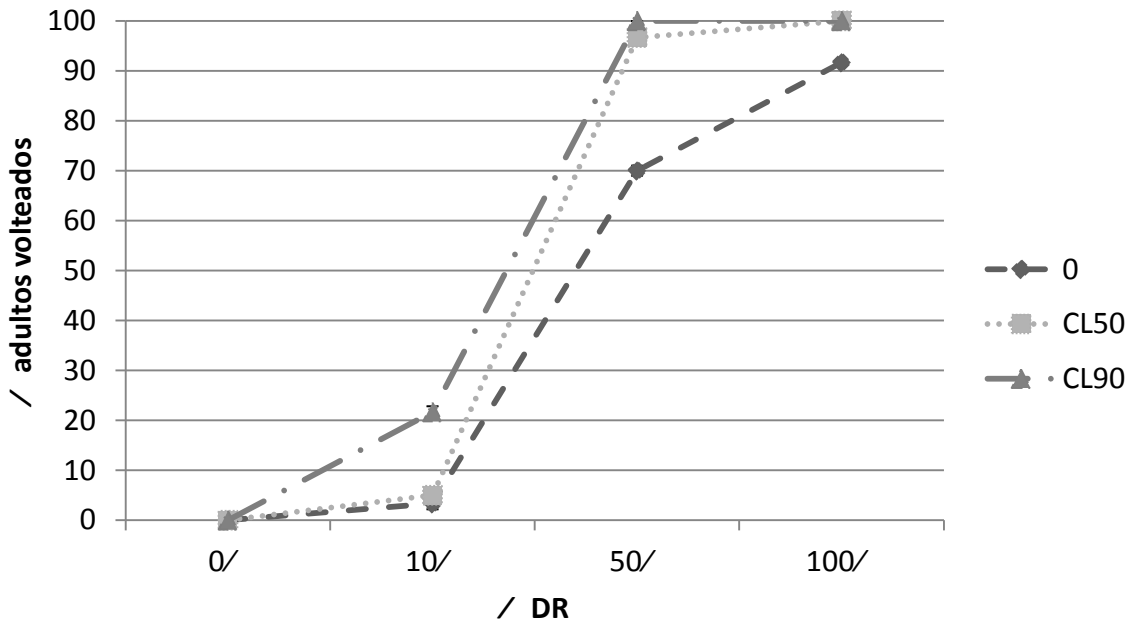


Figura 5.7. Porcentaje de adultos de *A. grandis* volteados a las 24 h luego del tratamiento con distintas concentraciones del insecticida Furia (/ DR) y de conidios de Ma 20 (0, CL₅₀ y CL₉₀).

La mortalidad de adultos de *A. grandis* a los 15 días del tratamiento mostró una interacción positiva entre las concentraciones del insecticida (/ DR) y de los conidios (CL) ($F_{/DR \times CL}(6,24) = 6,47$; $p < 0,001$, Figura 5.8). Por este motivo se estudiaron los efectos simples (concentración de insecticida x concentración de conidios). Con el 0 y 10 / DR del insecticida no se observaron diferencias en la mortalidad para ninguna de las concentraciones del hongo, por lo que la mortalidad de los picudos estaría mayormente dada por los conidios infectivos del aislamiento utilizado (Tabla 5.6, Figura 5.8). Al tratar con el 50 / DR del insecticida, se observó que el insecticida mató el 82 / , mientras que al agregar los conidios del hongo en las dos concentraciones (CL₅₀ y CL₉₀), la mortalidad aumentó al 100 / de los adultos. A pesar de que este efecto no fue significativo en el análisis, probablemente por la alta variabilidad obtenida en algunos de los tratamientos realizados, se puede observar que la interacción entre hongo-insecticida es positiva, debido a que con el 50 / DR y la CL₅₀ la mortalidad aumenta respecto a la CL₅₀ sola o con el el 10 / DR del insecticida. No es un efecto potenciado debido a que el insecticida al 50 / DR tiene un efecto sobre la mortalidad de los insectos. Tampoco sería un efecto sinérgico ya que el insecticida al 10 / DR no produce mortalidad y al agregar la CL₅₀ del

hongo la mortalidad es igual con o sin el insecticida. Según los resultados obtenidos, el efecto encontrado entre hongo-insecticida es aditivo. Finalmente, con el 100/ DR la mortalidad fue del 100/ con todos los tratamientos (Tabla 5.6, Figura 5.8). La figura 5.9 muestra el porcentaje de mortalidad por cada tratamiento y este porcentaje fue dividido en el porcentaje de individuos que fue confirmada la infección por *M. anisopliae* (✓ Ma) y el porcentaje en que no fue reaislado el hongo, por lo que se supone mortalidad por causa del insecticida químico (✓ insecticida). Se observa que al utilizar el hongo en la concentración CL₅₀, los tratamientos donde fue utilizado el insecticida en 50 y 100/ DR la mortalidad total aumentó, sin embargo la mortalidad por causa del hongo fue menor. Sin embargo, no se observa el mismo efecto al utilizar la CL₉₀ del hongo, donde el porcentaje de adultos muertos por la infección fúngica fue mayor con el 50 y 100/ DR del insecticida respecto a cuando este no fue utilizado.

Tabla 5.6. Número promedio de adultos muertos en cada tratamiento (±DE) luego de 15 días del bioensayo con distintas dosis de Ma 20 (sin conicios, CL₅₀ y CL₉₀) y distintas dosis del insecticida Furia (0, 10, 50 y 100/ DR).

/ DR	Sin conidios	CL ₅₀	CL ₉₀	
0/	0,33 (0,58) A,a	11,67 (6,35) AB, b	16,67 (1,15) A,b	F(2,6)= 15,00, p<0,004
10/	0 A,a	6,00 (6,08) A,ab	15,00 (2,00) A,b	F(2,6)= 12,51, p<0,007
50/	16,33 (4,04) B	19,67 (0,58) B	20,00 (0) B	F(2,6)= 12,33, p<0,19
100/	20,00 (0) B	20,00 (0) B	20,00 (0) B	----
	F(3,8)= 79,39 p<0,001	F(3,8)= 7,06 p<0,012	F(3,8)= 14,06 p<0,0015	

*Las medias seguidas por igual letra mayúscula indica diferencias no significativas entre las columnas, mientras que las medias seguidas por la misma letra minúscula indican diferencias no significativas entre las filas (prueba de Tukey, p < 0,05).

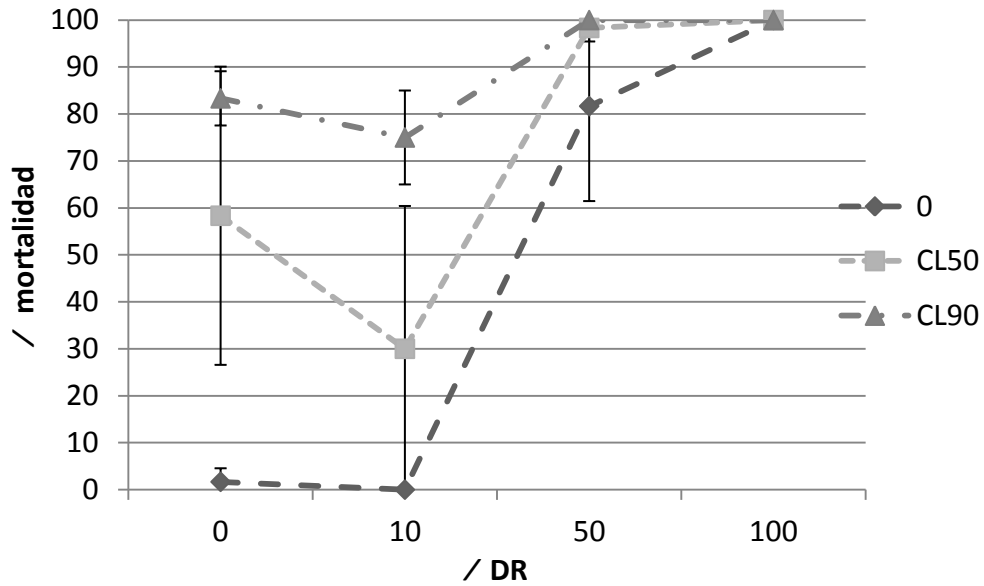


Figura 5.8. Porcentaje de mortalidad de adultos de *A. grandis* luego de 15 días para cada concentración del insecticida (∕ DR) y de los conidios (0, CL₅₀ y CL₉₀).

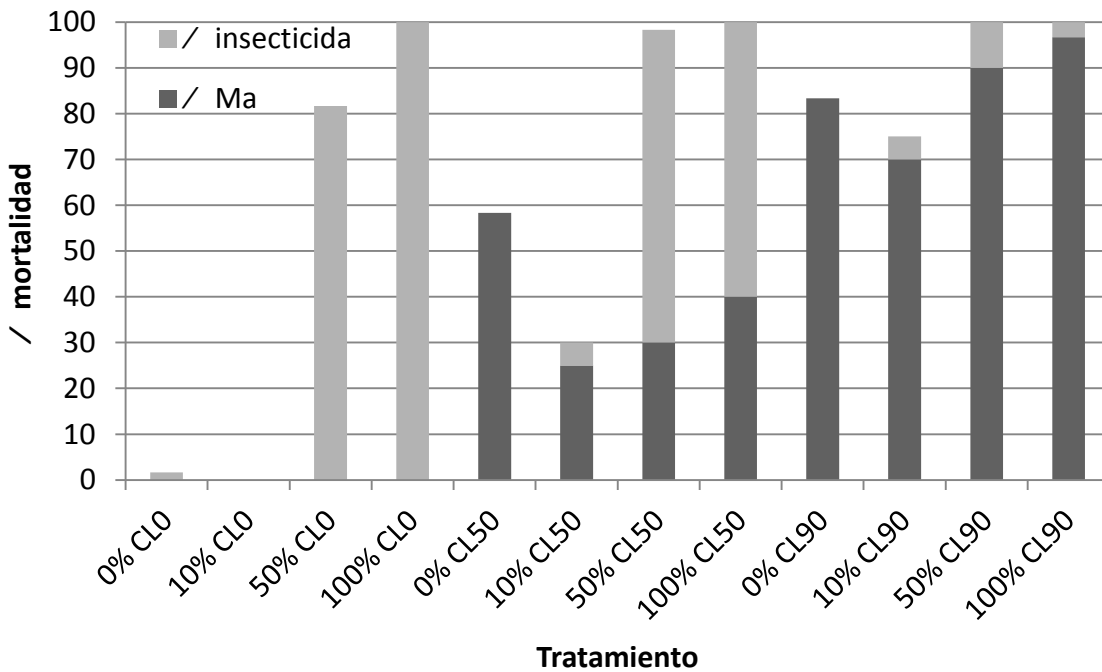


Figura 5.9. Porcentaje de mortalidad confirmada de adultos de *A. grandis* producida por *M. anisopliae* y por el insecticida en cada uno de los tratamientos.

5.3.3. Efecto de la temperatura

a) Efecto de la temperatura sobre la germinación de conidios

El porcentaje de germinación de conidios fue mayor al 94/ para todos los aislamientos incubados a 23, 27 y 30 °C (Tabla 5.7). Para los aislamientos Ma 20 y Ma 50 no se observaron diferencias significativas entre las distintas temperaturas de incubación en el porcentaje de germinación de los conidios ($F_{Ma20}(3, 12) = 1,56, p < 0,25$; $F_{Ma50}(3, 12) = 1,45, p < 0,28$) (Figura 5.10c). Respecto a los aislamientos de *B. bassiana*, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación de los conidios a las distintas temperaturas ($F_{Bb23}(3, 12) = 17959, p < 0,001$; $F_{Bb301}(3, 12) = 2833,2, p < 0,001$). El aislamiento Bb 23 tuvo la máxima germinación a 27 °C, mientras que para Bb 301, la máxima germinación se registró a los 23 y 27 °C (Tabla 5.7, Figura 5.10a). En ambos casos, no se observó germinación de los conidios a 35 °C (Figura 5.10b).

Tabla 5.7. Porcentaje de germinación de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* incubados a distintas temperaturas.

	Temperatura // Germinación (máx-mín)			
	23 °C	27 °C	30 °C	35 °C
Bb 23	97,26 (96,80-97,75) C	100,00 (100) A	98,11 (97,62-98,75) B	0,00 (0) D
Bb 301	99,63 (98,70-100) A	100,00 (100) A	94,51 (93,57-95,23) B	0,00 (0,00) C
Ma 20	99,82 (99,61-100)	100,00 (100)	98,68 (95,21-100)	100,00 (100)
Ma 50	99,39 (98,49-100)	100,00 (100)	97,85 (94,33-100)	96,43 (90,49-100)

*Las medias seguidas por la misma letra indica que no hay diferencias significativas entre las distintas temperaturas de incubación para cada uno de los aislamientos.

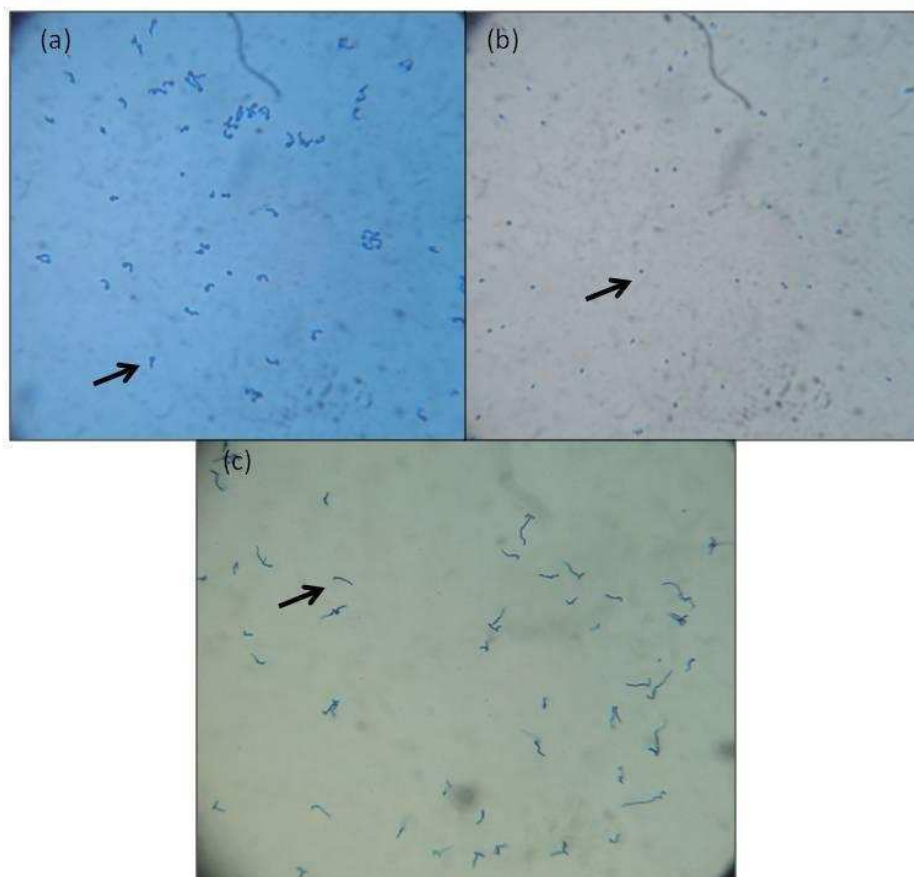


Figura 5.10. Observación de conidios en microscopio óptico (400x magnificación, tinción con azul de algodón en lactofenol), luego de la incubación a las respectivas temperaturas por 24 h de: (a) *B. bassiana* germinados a 30 °C, (b) *B. bassiana* no germinados a 35 °C y (c) *M. anisopliae* germinados a 30 °C.

b) Efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial de los aislamientos

El crecimiento radial de la colonia se ajustó a una recta en todos los aislamientos y a todas las temperaturas con un $R^2 < 0,90$, excepto a 35 °C donde el ajuste fue menor para los aislamientos de *B. bassiana* (debido a que la pendiente fue muy cercana a 0) y 38 °C donde no se registró crecimiento (Figuras 5.11 y 5.12; Tabla 5.8). La temperatura afectó significativamente a la TCR para todos los aislamientos ($F_{Bb\ 23}(4, 23) = 2549,84$, $p < 0,01$; $F_{Bb\ 301}(4, 24) = 2885,60$, $p < 0,01$; $F_{Ma\ 20}(4, 25) = 534,59$, $p < 0,01$; $F_{Ma\ 50}(4, 25) = 160,70$, $p < 0,01$). La

mayor tasa de crecimiento fue observada a los 27 °C, y este parámetro disminuyó a mayor y menor temperatura para todos los aislamientos, excepto para Ma 20 donde se no se encontraron diferencias significativas entre la TCR a 27 y 30 °C siendo máxima en estas temperaturas. Los aislamientos de *B. bassiana* crecieron más rápido que los de *M. anisopliae* a 23 y 27 °C ($F_{23\text{ °C}}(3,19) = 41,39, p < 0,001$; $F_{27\text{ °C}}(3,19) = 164,36, p < 0,001$). El aislamiento Bb 301 creció más lento respecto al resto de los aislamientos a partir de los 30 °C (menor tolerancia a altas temperaturas) ($F_{30\text{ °C}}(3,18) = 145,78, p < 0,001$). A 35 °C ningún aislamiento de *B. bassiana* creció, mientras que los aislamientos de *M. anisopliae* lograron crecer a una tasa lenta ($F_{35\text{ °C}}(3,20) = 12,968, p < 0,001$). Finalmente, ninguno de los aislamientos creció a 38 °C (TCR fue nula a esta temperatura) (Figuras 5.11 y 5.12, Tabla 5.8).

Respecto a la esporulación, se observó producción de conidios para todos los aislamientos a 23, 27 y 30 °C. A 35 °C sólo una repetición de Bb 23 y una de Bb 301 lograron esporular, mientras que ninguno de los ensayos con *M. anisopliae* esporuló a esta temperatura.

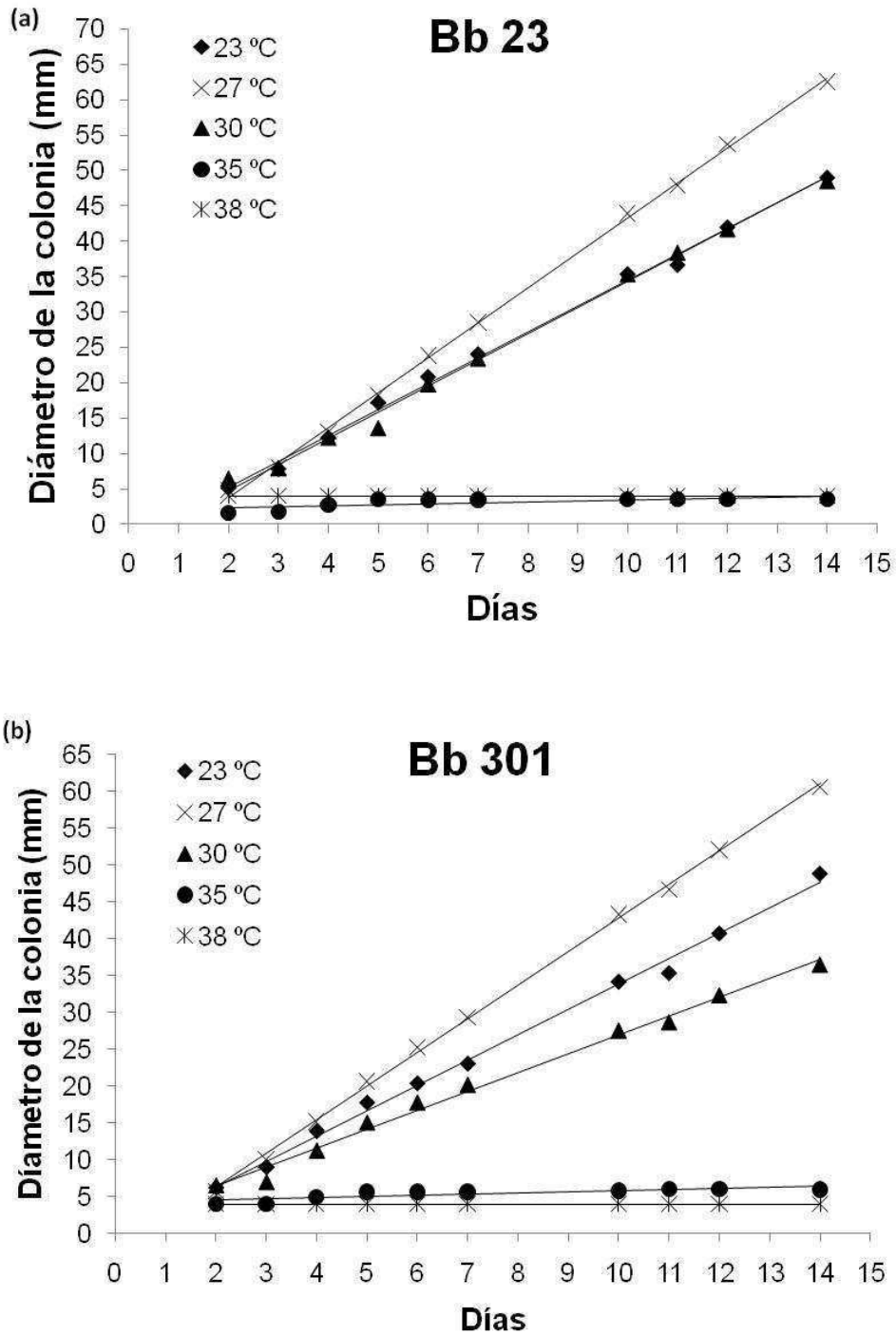


Figura 5.11. Crecimiento radial en función de los días a las distintas temperaturas de incubación de dos aislamientos de *B. bassiana* (a = Bb 23, b= Bb 301).

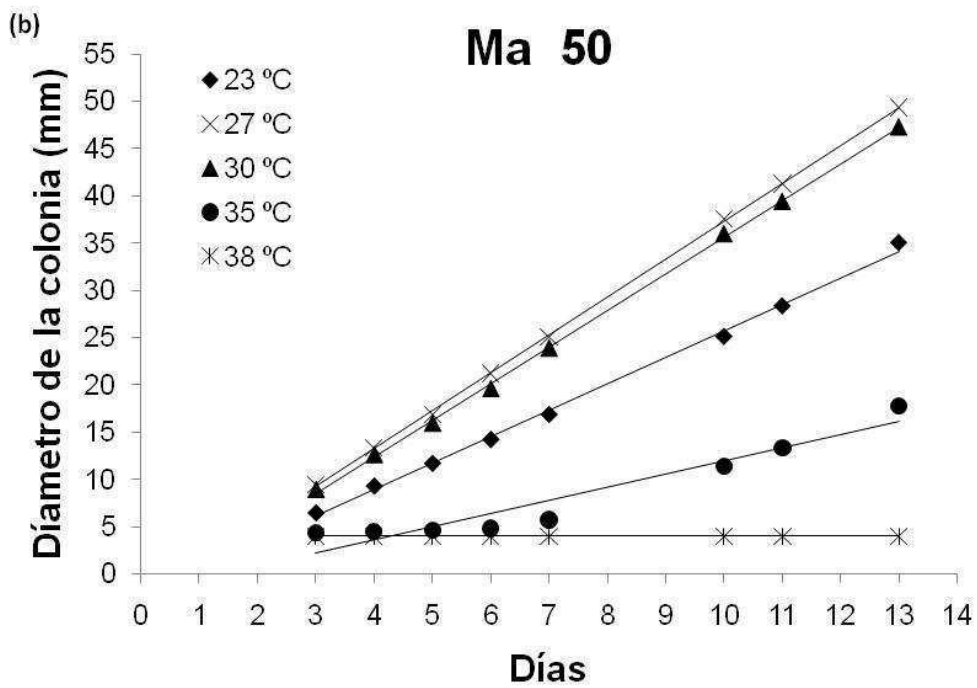
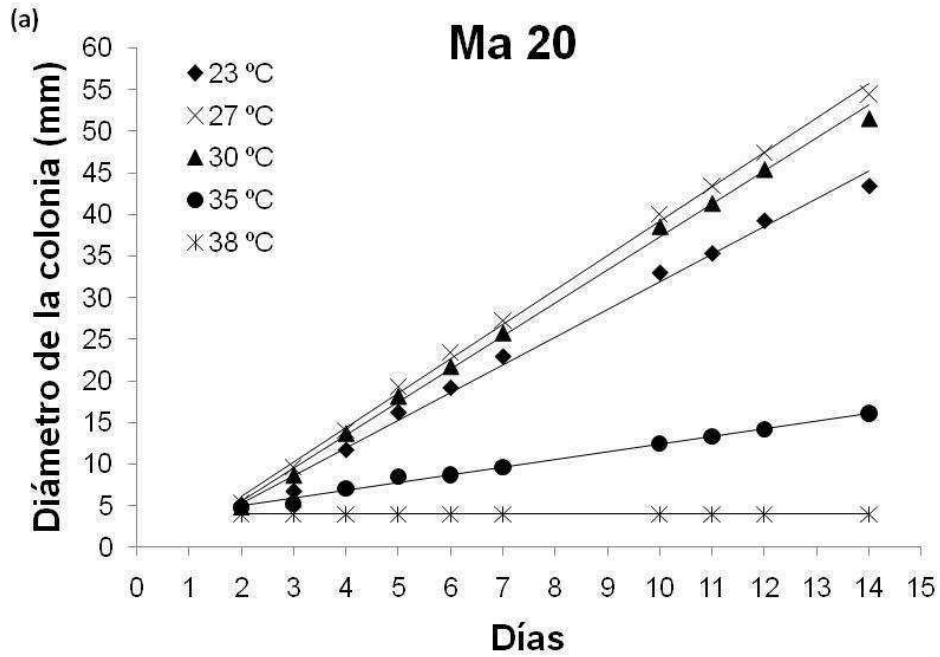


Figura 5.12. Crecimiento radial en función de los días a las distintas temperaturas de incubación de dos aislamientos de *M. anisopliae* (a= Ma 20, b= Ma 50).

Tabla 5.8. Tasa promedio de crecimiento radial (TCR; mm/día), estimada como la pendiente de la recta (diámetro colonia (mm) = TCR x tiempo (día) + b) y R² de ajuste a la misma, de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* durante 14 días de incubación a las distintas temperaturas.

T °C	Aislamiento							
	Bb 23		Bb 301		Ma 20		Ma 50	
	TCR (DE)	R ²	TCR (DE)	R ²	TCR (DE)	R ²	TCR (DE)	R ²
23	3,64 (0,12)	0,996	3,44 (0,13)	0,994	3,32 (0,13)	0,992	2,71 (0,21)	0,997
	B, a*		B, ab		B, b		B, c	
27	4,98 (0,08)	0,999	4,55 (0,12)	0,999	4,09 (0,10)	0,998	4,02 (0,03)	0,999
	A, a		A, b		A, c		A, c	
30	3,77 (0,06)	0,996	2,56 (0,07)	0,989	3,92 (0,19)	0,997	3,84 (0,13)	0,999
	B, a		C, b		AB, a		A, a	
35	0,11 (0,18)	0,44	0,13 (0,07)	0,610	0,92 (0,77)	0,989	1,38 (0,32)	0,919
	C, a		D, a		C, b		C, b	
38	0		0		0		0	
	C		D		D		D	

* Iguales letras minúsculas indican que no hay diferencias significativas entre las medias en cada línea (temperatura); iguales letras mayúsculas indican que no hay diferencias significativas en cada columna (aislamiento) (Prueba de Tukey, p < 0,05).

c) Efecto de la temperatura en la virulencia

La mayoría de los insectos testigo (sin tratar con conidios de los aislamientos evaluados) sobrevivieron al final del período del ensayo (20 días). Solamente tres adultos testigo de una réplica incubada a 35 °C no sobrevivieron. Los porcentajes de mortalidad de los adultos tratados con los aislamientos de *B. bassiana* no mostraron diferencias significativas entre 20 y 27 °C. Pero al incubar a 35 °C la mortalidad disminuyó significativamente y cerca de un 90% de los adultos sobrevivieron ($F_{Bb\ 23}(2,6) = 52,86$, $p < 0,001$; $F_{Bb\ 301}(2,6) = 135,71$, $p < 0,001$). La temperatura de incubación no afectó la mortalidad de los adultos tratados con los aislamientos de *M. anisopliae* ($F_{Ma\ 20}(2,6) = 2,40$, $p < 0,17$; $F_{Ma\ 50}(2,6) = 4,83$, $p < 0,06$). El aislamiento más virulento a 35 °C fue Ma 20, donde el porcentaje de mortalidad de los adultos fue $95 \pm 5\%$ (Figura 5.13).

El aislamiento que menor TS_{50} presentó a todas las temperaturas fue Ma 20. El TS_{50} fue menor cuando los insectos se incubaron a 27 °C para los aislamientos Bb 23, Bb 301 y Ma 20. El menor TS_{50} fue para Bb 301 y Ma 20 donde el 6º día se observó mortalidad de más del 50% de la población. A 20 °C el menor TS_{50} fue 8 días para el aislamiento Ma 20. A 35 °C no se pudo calcular el TS_{50} para los aislamientos de *B. bassiana* (la mortalidad observada fue menor al 50%), mientras que para ambos aislamientos de *M. anisopliae* fue 8 días (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Tiempo de supervivencia media (TS_{50}) (Intervalo de Confianza del 95% de Andersen ($IC_{95\%}$), días) de adultos de *A. grandis* inoculados con 5×10^8 conidios/ml de los distintos aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, y a tres temperaturas de incubación distintas.

Aislamiento	20 °C	27 °C	35 °C
Bb 23	13,00 (10,75 - 15,24)	8,00 (7,20 - 8,79)	n.o.
Bb 301	9,00 (8,34 - 9,66)	6,00	n.o.
Ma 20	8,00 (7,47 - 8,53)	6,00 (5,71 - 6,30)	8,00 (7,57 - 8,43)
Ma 50	n.o.	8,00	8,00 (7,29 - 8,71)
Control	n.o.	n.o.	n.o.

n.o. = no fue calculado debido a que las mortalidades fueron inferiores al 50%.

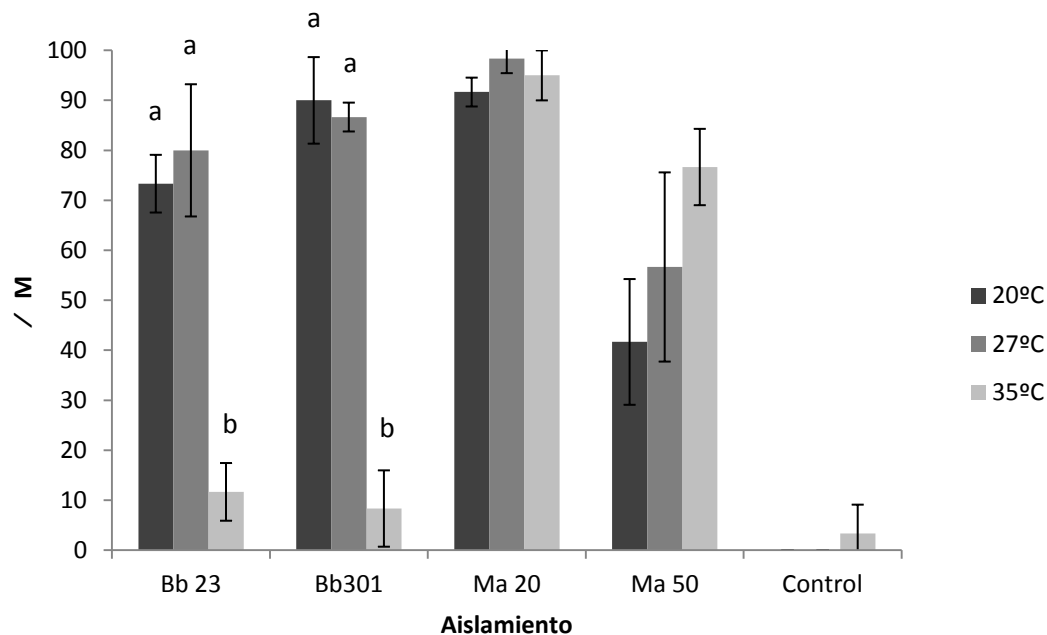


Figura 5.13. Porcentaje de mortalidad (\emptyset M) de los adultos de *A. grandis* a distintas temperaturas de incubación, tratados con una suspensión de conidios de 5×10^8 conidios/ml de los aislamientos Bb 23, Bb 301, Ma 20 y Ma 50. Iguales letras minúsculas sobre las barras indica que no hay diferencias significativas entre los \emptyset M a las distintas temperaturas para cada aislamiento (ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey, $p < 0,05$).

5.4. Discusión

5.4.1. Efecto de los insecticidas químicos sobre los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* virulentos para el picudo del algodónero

Los tres insecticidas evaluados tuvieron efectos variables sobre los distintos aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. En otros trabajos donde se evaluó el efecto de distintos insecticidas, fungicidas o herbicidas sobre cepas de hongos entomopatógenos, se encontró esta variabilidad de respuestas (Anderson y Roberts, 1983; Li y Holdom, 1994; Tamai et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Alizadeh et al., 2007; Asi et al., 2010). Ramaraje et al. (1967)

probaron el efecto de varios insecticidas sobre el crecimiento de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y concluyeron que a distintas concentraciones de los insecticidas los efectos son diferentes sobre el crecimiento y esporulación de los hongos y la respuesta también difiere con los distintos productos.

En este trabajo se encontró que el insecticida endosulfán fue el más perjudicial para todos los aislamientos evaluados donde el 50% DR inhibió completamente los conidios de *B. bassiana* y disminuyó considerablemente los de *M. anisopliae*. Resultados similares obtenidos en estudios previos, encontraron que la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* era muy baja o nula cuando estos son tratados con formulaciones de endosulfán (Alves et al., 1998; Oliveira et al., 2003; Alizadeh et al., 2007). Este insecticida es ampliamente utilizado en el campo a pesar de que presenta una importante toxicidad hacia otros organismos. Más aún, el SENASA aprobó una resolución (Res. 511/2011), donde se prohíbe el registro, elaboración, comercialización, importación y utilización de productos que tengan como principio activo endosulfán a partir del 01/07/2011, presentando además un cronograma de eliminación progresiva de los mismos.

Los insecticidas piretroides, zetametrina y beta-cipermetrina, fueron menos tóxicos para todos los aislamientos de hongos entomopatógenos. Sin embargo, los aislamientos de *B. bassiana* fueron incompatibles con altas dosis de estos insecticidas, mientras que algunos de los aislamientos de *M. anisopliae* lograron crecer con el 100% DR de zetametrina o beta-cipermetrina. Rachappa et al. (2007) estudiaron el efecto de distintos insecticidas organofosforados, carbamatos, organoclorados y piretroides sobre el crecimiento y esporulación de *M. anisopliae* y observaron que existen diferencias en las respuestas según la naturaleza química de los compuestos. Los insecticidas organoclorados (por ejemplo, endosulfán y dicofol) son los más dañinos para el hongo, los organofosforados (también utilizados comúnmente en el cultivo de algodón) tienen resultados variables, clorpirifós y malatión fueron más perjudiciales, mientras que profenofós fue el menos dañino. El grupo de los piretroides es por lo general el más compatible (Rachappa et al., 2007).

Si bien el modo de acción de los ingredientes activos son posiblemente uno de los factores principales involucrados en el nivel de toxicidad de los productos fitosanitarios sobre los hongos entomopatógenos, hay una gran variabilidad entre los productos dentro de un mismo grupo químico y entre productos que tienen el mismo principio activo (Tamai et al., 2002). Por ejemplo, Anderson y Roberts (1983) observaron que formulaciones de insecticidas del tipo líquidos emulsionables (CE) tuvieron mayor efecto inhibitorio respecto a polvos mojables (WP). Estas diferencias pueden estar asociadas con compuestos que se encuentran dentro de la formulación y que resultan tóxicos. Por este motivo, no sólo se debe conocer la compatibilidad con un determinado ingrediente activo, sino saber la compatibilidad con el producto formulado final (Li y Holdom, 1994).

Por último, hay que destacar que la mayoría de los trabajos realizados para evaluar el efecto de los productos químicos sobre los hongos entomopatógenos son *in vitro*. En estas condiciones, una elevada toxicidad del producto sobre los conidios no siempre sugiere alta toxicidad en el campo, donde existen varios factores que obstaculizan esta exposición, protegiendo al entomopatógeno (Alves et al., 1998).

En este trabajo se pudo observar un efecto aditivo entre el aislamiento Ma 20 y zetametrina sobre la mortalidad de adultos de picudo. A las 24 h, el número de volteos aumentó al 100% utilizando el 50% DR del insecticida y el CL₅₀ del hongo. El mismo resultado fue obtenido al considerar la mortalidad de picudos a los 15 días. Este resultado demuestra que reduciendo la dosis de insecticida y del hongo se puede obtener una gran disminución de la plaga en el campo, y de esta manera no se estaría produciendo la aparición de resistencia por la utilización de dosis subletales. Distintos efectos (sinérgicos, antagónicos o aditivos) en la toxicidad de los hongos entomopatógenos en combinación con los insecticidas han sido demostrados. La acción de *B. bassiana* asociada con los insecticidas deltametrina y cipermetrina sobre adultos de *A. grandis* en el campo a sido evaluada por Bleicher et al. (1992). Estos autores observaron una respuesta sinérgica entre *B. bassiana* con una subdosis del insecticida deltametrina. Anderson et al. (1989) observaron que *B. bassiana* combinado con 5

insecticidas fueron consistentemente más tóxicos que al utilizar *B. bassiana* solo contra larvas del coleóptero *L. decemlineata* y concluyen que el uso de mezclas de cantidades subletales de los insecticidas compatibles con *B. bassiana* podría ser una ventaja en el manejo de este coleóptero. Además, el incremento de factores de mortalidad utilizados contra este coleóptero podría retrasar la expresión de resistencia a los nuevos insecticidas. Quintela y McCoy (1997), encontraron un aumento en la virulencia de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre larvas de primer estadio de *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) al combinarlos con dosis subletales de Imidacloprid. Purwar y Sachan (2006) encontraron que los distintos insecticidas tienen distintos efectos en la toxicidad contra larvas de *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae) cuando estos son mezclado con *B. bassiana* o *M. anisopliae*. En muchos casos, las combinaciones fueron más tóxicas que al utilizar sólo el hongo, a excepción de mezclas con los insecticidas lufenuron, endosulfán, diflubenzuron y dimetoato.

Los productos Atrion (beta-cipermetrina) y Furia (zetametrina) pueden ser considerados para su utilización en combinación con los aislamientos de hongos seleccionados, en dosis compatibles dentro de programas de MIP. La generalización del efecto de los insecticidas sobre el hongo no puede ser realizada, ya que la interacción entre ambos puede variar entre aislamiento y con la naturaleza química de los insecticidas (tanto principio activo como formulaciones comerciales). Por lo cual se remarca la importancia de realizar ensayos de compatibilidad entre los aislamientos que se utilizarán y los insecticidas. De esta forma, se puede realizar un plan de manejo, combinando ambas técnicas sin perder rendimiento, o en muchos casos aumentándolo, y pudiendo reducir los costos debido a una reducción en la cantidad de aplicaciones realizadas sobre un cultivo. Por último, es importante saber cómo es la interacción en el campo y si es posible extrapolar los resultados obtenidos en el laboratorio.

5.4.2. Efecto de la temperatura sobre los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

En este trabajo, al igual que lo citado por otros autores, la respuesta a la temperatura de incubación varió según la especie de hongo y el aislamiento (Ying y Feng, 2004; Rangel et al., 2005).

La temperatura óptima para la germinación fue de 27 °C para *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las distintas temperaturas de incubación para la germinación de conidios de *M. anisopliae*, probablemente causado por desvíos mayores en esta especie respecto a *B. bassiana*. En otros trabajos donde se estudió la germinación de conidios de estas especies, encontraron que las temperaturas óptimas para la germinación son entre 25 - 30 °C, pero existe una gran variabilidad según la cepa y especie del hongo (Glare y Milner, 1991; Ekesi et al., 1999; Tefera y Pringle, 2003).

Los aislamientos de *M. anisopliae* resultaron más termotolerantes respecto a los de *B. bassiana*, debido a que solamente los dos aislamientos de *M. anisopliae* lograron germinar a 35 °C y el porcentaje de conidios germinados a esta temperatura fue alto (100 y 96,4/ de conidios germinados para Ma 20 y Ma 50, respectivamente). Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores, donde el límite superior para la germinación de conidios de *M. anisopliae* fue cerca de 37 °C (Walstad et al., 1970) y entre 37-40 °C para el crecimiento del micelio (Fargues et al., 1997). En otros trabajos observaron que la tolerancia al estrés térmico es mayor para aislamientos de *M. anisopliae* respecto a *B. bassiana* o *Paecilomyces lilacinus*. Sin embargo, algunos aislamientos de *M. anisopliae* no logran crecer a 35 °C (Glare y Milner, 1991; Tefera y Pringle, 2003), o presentan una fuerte disminución de la germinación a esta temperatura (Dimbi et al., 2004).

McCammon y Rath (1994) estudiaron la tasa de germinación de 122 aislamientos de 16 cepas de *M. anisopliae* en el rango de temperaturas de 2,5 a 37 °C. Estos autores encontraron mediante un análisis canónico de los datos de germinación que un grupo de cepas son activas

con frío (capaces de germinar a 5 °C). El resto de las cepas se pueden separar en dos grupos, un grupo de cepas activas a 37 °C y otro en que las cepas no germinan ni a 5, ni a 37 °C. Sin embargo, con temperaturas subóptimas las distintas cepas germinan a distintas tasas (McCammon y Rath, 1994).

Respecto al crecimiento del micelio, la tasa de crecimiento radial (TCR) fue mayor para todos los aislamientos a 27 °C. Sin embargo se observó que a menor temperatura de incubación (23 °C) los aislamientos de *B. bassiana* tuvieron mayor TCR, mientras que a mayor temperatura (30 °C) los aislamientos de *M. anisopliae* presentaron mayor TCR, y a 35 °C únicamente los aislamientos de esta especie lograron crecer. Este resultado concuerda con lo encontrado en la germinación, donde *M. anisopliae* es más termoactivo respecto a *B. bassiana*. Asimismo, otros autores reportan que a pesar de la variabilidad entre los aislamientos, en general, los aislamientos de *B. bassiana* son activos a temperaturas frías, mientras que los de *M. anisopliae* son más termoactivos (Ouedraogo et al., 1997; Tefera y Pringle, 2003; Fernandes et al., 2008; Li y Feng, 2009). Milner et al (2002) encuentran que los aislamientos de *M. anisopliae* tienen un rápido crecimiento micelial entre 20 y 30 °C, pero no observaron crecimiento a 35 °C. Por otro lado, Ekesi et al (1999) encontraron que el límite superior de temperatura para el crecimiento de esta especie es de 35 °C, mientras que Ouedraogo et al (1997) vieron que la mayoría de los aislamientos crecen entre 11 y 32 °C, aunque algunos logran crecer entre 8 y 37 °C, pero ninguno crece a 40 °C.

Li y Feng (2009) probaron la termotolerancia de aislamientos de *M. anisopliae* exponiéndolos a temperaturas muy elevadas durante distintos períodos de tiempo y observaron que la tolerancia de los conidios a estrés térmico es diferente entre los aislamientos. La tasa de supervivencia es cero o cercana a cero entre los 30 y 180 min. de exposición a 48 °C.

Todas las repeticiones de ambas especies realizadas en este trabajo esporularon a 23, 27 y 30 °C. A 35 °C, sólo una repetición de Bb 23 y una de Bb 301 lograron esporular, mientras que

ninguna de las repeticiones de *M. anisopliae* lo hizo a esta temperatura. Tefera y Pringle (2003) vieron que la temperatura óptima de esporulación fue 25 °C para los aislamientos de *M. anisopliae*. El hecho de no encontrar esporulación a 35 °C de ningún aislamiento de *M. anisopliae*, puede deberse a que las placas fueron incubadas en oscuridad, condición bajo la cual no se beneficia el desarrollo de los conidios, y en consecuencia requiriendo fotoperiodo para la producción de los mismos (observación personal). Sin embargo, dentro de un control del tipo inoculativo, donde se utiliza al hongo en forma similar a un insecticida químico sin tener como objetivo que el hongo se establezca y reproduzca en el campo, la esporulación a altas temperaturas no sería un parámetro determinante para el uso de estas cepas en el control del picudo del algodonoero.

La inhibición de la germinación y crecimiento radial de los aislamientos de *B. bassiana* a 35 °C se vio reflejada en una disminución de la virulencia de estos aislamientos. Consecuentemente, la capacidad de un aislamiento de germinar bajo determinadas condiciones climáticas podría ser determinante de la eficacia (McCammon y Rath, 1994). Sin embargo, la relación de la termotolerancia medida *in vitro* y el desarrollo de la enfermedad debe ser establecida según el sistema de estudio (Ouedraogo et al., 1997). La germinación y crecimiento rápido de aislamientos de *M. anisopliae* fue correlacionado con alta patogenicidad de *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) (Samuels et al., 1989). Contrariamente, Tefera y Pringle (2003) no encontraron una relación consistente entre la virulencia, germinación de conidios, crecimiento vegetativo y esporulación indicando que hay otros factores que gobiernan la virulencia de los aislamientos.

Un resultado interesante observado en este trabajo, fue que el TS_{50} aumentó a temperaturas subóptimas, a pesar de que el porcentaje de mortalidad fue el mismo. Ferron (1978) observó que temperaturas menores a las óptimas retardan el desarrollo de la micosis sin necesariamente afectar la mortalidad total. Similarmente, aislamientos de *M. anisopliae* fueron más efectivos contra tres especies de moscas de la fruta a 30 °C y a menores temperaturas la enfermedad fue retrasada pero no se afectó a la mortalidad total (Dimbi et al., 2004).

Por último, muchos autores intentaron explicar la variabilidad en la termotolerancia de las distintas cepas con la latitud geográfica de donde éstas son aisladas. Sin embargo, nunca se encontró una correlación entre estos dos factores (Devi et al., 2005). Las limitantes térmicas podrían no ser resultado de condiciones ambientales, sino estar relacionadas con el comportamiento de termorregulación del hospedador o el microhábitat en que este se encuentra (Ouedraogo et al., 1997; Li y Feng, 2009). Ouedraogo et al. (2003, 2004) sugieren que las cepas de *M. anisopliae* aisladas de especies de langostas donde existe un comportamiento de termorregulación en respuesta a los patógenos resultan más termotolerantes. En campos de cultivos, los límites superiores de temperatura en verano pueden llegar a estar en un rango entre 38-48 °C, a pesar de la variación geográfica (Li y Feng, 2009). Lograr obtener aislamientos de estos ambientes podría ser beneficioso para el control de una plaga que se encuentre en ese cultivo.

Capítulo 6

Producción masiva, formulación y ensayos en campo

6.1. Introducción

El uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas perjudiciales para la agricultura depende de diferentes factores, incluyendo la capacidad de producir altas concentraciones estables del propágulo a un costo razonable (Machado et al., 2010). Los hongos entomopatógenos son por lo general utilizados mediante una liberación inundativa, donde el ambiente que se encuentra la plaga es inundado con altas concentraciones del propágulo infectivo (Eilenberg et al., 2001). Por esta razón, la producción masiva de conidios de hongos entomopatógenos para el control biológico de insectos es un área de gran interés.

Los procesos de producción masiva y formulación influyen directamente sobre los costos, vida útil (permanecer viable e infectivo durante el almacenamiento), virulencia y eficacia a campo de los productos fúngicos (Jackson et al., 2010). El proceso de producción para bioinsecticidas fúngicos, debe tener un costo reducido y producir altas concentraciones de conidios viables, virulentos, y persistentes en el tiempo (Kassa et al., 2008). Existen distintas tecnologías de producción y formulación para el desarrollo de conidios de hongos entomopatógenos. El tipo de proceso utilizado depende de la especie fúngica, la plaga que se desea controlar, el ambiente, formulación, estrategias de aplicación, producto final deseado y el mercado (Kassa et al., 2008).

Conocer el ciclo de vida de estos hongos es importante para comprender cómo deben ser formulados y utilizados. Varios estadios diferentes en el ciclo de vida de estos hongos son potenciales candidatos para micoinsecticidas comerciales. El conidio aéreo, producido sobre los cadáveres de insectos, en el medio agarizado o sobre sustrato sólido, es el agente de diseminación e infección de estos hongos en la naturaleza. Los conidios han evolucionado como agentes de dispersión e infección, y de esta forma poseen una relativa resistencia a los factores ambientales, particularmente desecación. Estos conidios pueden mantener la viabilidad por largo tiempo, especialmente en condiciones de baja temperatura, lo cual los hace apropiados para el almacenamiento durante largos períodos (Jaronski, 1997). La blastospora es la unidad

de la fase levaduriforme que se produce dentro del hemolinfa del insecto, o en cultivos líquidos sumergidos, particularmente para *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *Isaria fumosarosea* e *I. farinosa*. Esta es infectiva y germina más rápido que los conidios, pero es mucho más sensible a las condiciones ambientales, presentando sólo algunos meses de viabilidad en condiciones refrigeradas (Jaronski, 1997; Arzumanov et al., 2005). Por estas razones, dependiendo del sistema en el que se esté trabajando, es importante una buena elección de la unidad infectiva a utilizar.

Más de 150 productos basados en hongos entomopatógenos han sido comercializados en otros países y más del 75% de estos productos está basado en los hongos hipocreales, tales como *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. fumosarosea* y *B. brongniartii* (Faria y Wraight, 2007). Dos tercios de estos productos comercializados son compuestos por conidios de las dos primeras especies citadas, usando un proceso de fermentación en sustrato sólido. Tanto *B. bassiana* como *M. anisopliae*, tienen muchos aislamientos que producen altas concentraciones de conidios aéreos cuando se los hace crecer en sustratos sólidos ricos en nutrientes (Jackson et al., 2010). El cultivo en fase sólida es un proceso que se adapta adecuadamente al metabolismo de estos hongos. Si bien existen varios trabajos que evalúan los efectos de diferentes factores en el metabolismo de hongos sobre la fermentación en estado sólido, existe muy poca evidencia de cómo realizar este proceso a una escala industrial lo cual presenta un inconveniente en la comercialización de estos productos (Durand, 2003).

La etapa de producción masiva en sustrato sólido proporciona un soporte físico para producir los conidios aéreos. Por lo general, el sustrato es un cereal o subproducto de cereales, tales como el arroz, mijo, maíz o salvado de trigo. El hongo utiliza una cierta proporción de los nutrientes suministrados por estos cereales durante el crecimiento y esporulación, pero la mayoría de la potencia calorífica permanece sin utilizar. En algunos aspectos, la estructura del sustrato podría ser más importante que los nutrientes suministrados. Por lo tanto, un sustrato ideal sería aquel que proporciona una gran superficie para el crecimiento además de poseer espacios entre las partículas para aireación y formación de conidios. Por esta razón, arroz

blanco partido es el sustrato más comúnmente utilizado en la producción de *B. bassiana* y *M. anisopliae* debido a que las partículas individuales de arroz son pequeñas, proporcionando una gran superficie, además de permanecer separados el uno del otro después de la esterilización en autoclave y la inoculación (LUBILOSA, Lutte Biologique contre les Locustes et Sauteriaux, www.lubilosa.org).

La retención de una alta viabilidad y virulencia de los conidios de hongos entomopatógenos durante el almacenamiento y luego de la aplicación es esencial para un control biológico efectivo de insectos en el campo. Identificar los factores que afectan la longevidad durante la producción y manipuleo post-cosecha de los conidios es importante para su uso como micoinsecticidas (Hong et al., 2000). La viabilidad y/o virulencia de los conidios puede disminuir con el tiempo de almacenaje. Es necesario mantener las unidades infectivas en un estado latente, seguro y fácil para la aplicación. La latencia de los conidios es exógena, no constitutiva, y la clave es prolongar la supervivencia frenando la germinación y reduciendo el metabolismo tanto como sea posible. Los conidios poseen tres requerimientos para germinar: nutrientes, agua y oxígeno. Una posibilidad de mantenerlos latentes es la deshidratación, reduciendo la actividad acuosa a ciertos niveles. En general, la longevidad es incrementada al reducir la temperatura de almacenamiento y el contenido de humedad (Hong et al., 2000). Sin embargo, la longevidad intrínseca de los conidios bajo condiciones de almacenamiento óptimas puede variar dependiendo de la especie o del aislamiento dentro de la misma especie del hongo (Jaronski, 1997; Hong et al., 2001). La vida útil de los conidios de hongos entomopatógenos, puede ser afectada por condiciones nutricionales y ambientales durante la producción y secado. Se observó que el contenido inicial de humedad del polvo de conidios y la velocidad de secado puede afectar la vida útil de conidios de *M. flavoviride* y *B. bassiana* (Jackson et al., 2010).

La formulación juega un rol importante en el campo en el encuentro entre el hongo entomopatógeno y la plaga. Las formulaciones fúngicas son típicamente preparadas como concentrados técnicos: propágulos de los hongos combinados con subproductos de la

producción y un mínimo de adyuvantes, polvos mojables: propágulos de los hongos secos formulados para ser dispersados en agua y aplicados como una suspensión, y aceites emulsionables: para los conidios hidrofóbicos los propágulos son suspendidos en un líquido inmiscible en agua y se suspende en agua antes del uso (Jackson et al., 2010). Existen muchas variables a tener en cuenta en el momento de la formulación. Los hongos entomopatógenos actúan por contacto, por lo tanto, tener en cuenta la superficie donde se va a aplicar el micoinsecticida según la plaga que se va a controlar, ayuda a elegir el tipo de formulación (Jackson et al., 2010). Los conidios aéreos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* son altamente hidrofóbicos debido a las glicoproteínas que poseen en la superficie (Bidochka et al., 1995) por lo cual es apropiado utilizar aceites en la formulación. Además, los aceites aumentan la estabilidad, dan mayor persistencia en el campo y un aumento de la virulencia (Peng y Xia, 2011), defendiendo al producto de las condiciones ambientales, tales como baja humedad, la radiación UV, y alta temperatura. Por último, se añaden tensioactivos con el fin de reducir la tensión superficial de las soluciones acuosas y lograr mojar la superficie a tratar (Jackson et al., 2010).

El objetivo general del presente capítulo fue evaluar la capacidad de cuatro aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, virulentos para el picudo del algodón, de ser producidos masivamente, obtener formulaciones y estudiar su eficiencia en el campo.

Objetivos particulares:

- Comparar los parámetros de producción de los aislamientos seleccionados para *A. grandis* a distintos tiempos de incubación.
- Estudiar la viabilidad de los conidios producidos en sustrato sólido en el tiempo.
- Evaluar la virulencia de los aislamientos producidos en forma masiva sobre adultos de *A. grandis*.
- Obtener formulados experimentales realizados por la empresa Laboratorios Biagro S.A. y evaluar la viabilidad de los conidios formulados.

- Realizar ensayos en condiciones de campo sobre plantas de algodón y rastrojo para evaluar la eficiencia del micoinsecticida.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Descripción del proceso de producción

El método más comúnmente utilizado es el de fermentación difásico líquido – sólido en bolsas plásticas utilizando arroz como sustrato sólido para la producción de conidios (Arcas et al., 1999). Este método consiste en la producción del inóculo en una fermentación sumergida donde el hongo crece en forma micelial. Esta multiplicación del inóculo es más sencilla de llevar a cabo y mantener en condiciones asépticas. Sin embargo, es difícil de cuantificar la cantidad de inóculo utilizado. Una alternativa es utilizar la suspensión de esporas para inocular el sustrato sólido. Esto facilita que se mezcle con el sustrato y permite estandarizar el proceso de inoculación (Arzumanov et al., 2005).

A continuación se detallan los pasos de producción (modificado a partir de Cherry et al. (1999)):

i. Mantenimiento de los aislamientos: Los aislamientos utilizados fueron obtenidos de la micoteca perteneciente al Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (IMYZA, INTA Castelar), los cuales son conservados de manera que no haya pérdida de la virulencia (Capítulo 2).

ii. Preparación del inóculo: Se realizaron suspensiones a una concentración de 1×10^8 conidios/ml según lo explicado en Capítulo 2 (Figura 6.1).

iii. Preparación del sustrato sólido: Se pesó y distribuyó el arroz parboil en bolsas de polipropileno de 30 x 60 cm autoclavable y se adicionó una cantidad suficiente de agua (relación 2:1 arroz:agua destilada). Las bolsas fueron cerradas y esterilizadas en autoclave durante 20 min. a 121 °C y 1 atm de presión. Las bolsas se enfriaron a temperatura ambiente.

iv. Inoculación del sustrato: Las bolsas fueron inoculadas dentro de una cabina de flujo laminar utilizando 1 ml de la suspensión de conidios (inóculo) de los aislamientos a producir (ver paso ii).

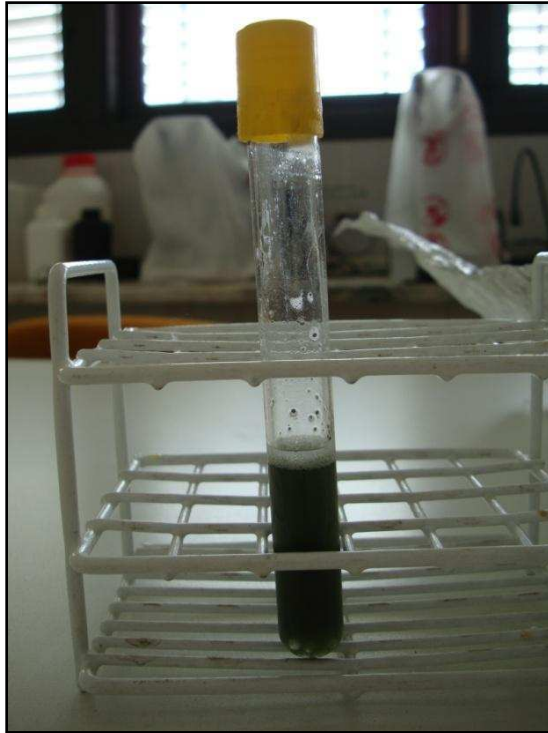


Figura 6.1. Suspensión de conidios de *M. anisopliae* (1×10^8 conidios/ml) utilizada como inóculo para las bolsas de arroz.

v. Incubación del sustrato: Las bolsas se incubaron a 27 ± 2 °C de 10 a 14 días (excepto en ensayos que se indica el tiempo de incubación) en oscuridad. La humedad dentro de las bolsas alcanza el 100% (Figura 6.2.).



Figura 6.2. Bolsas conteniendo arroz inoculado con *B. bassiana* y *M. anisopliae* en incubación.

vi. Secado: Una vez que el hongo esporuló, las bolsas fueron transferidas a una sala de secado acondicionada con deshumificadores y ventiladores. Las bolsas se abrieron completamente dejando expuesto el arroz y fueron secadas durante dos días. La humedad dentro de la sala se mantuvo entre el 20 y 30% HR (Figura 6.3a y b).

vii. Cosecha: El arroz con los conidios es tamizado en un tamiz N° 50 de 297 μm de malla durante 15 min en un sistema de tamizado con golpe vertical (Figura 6.4a). De esta forma se separan los conidios de los granos de arroz (Figura 6.4b).



Figura 6.3. Conidios de (a) *M. anisopliae* y (b) *B. bassiana* producidos sobre arroz en el proceso de secado.



Figura 6.4. (a) Tamices conteniendo el arroz y los conidios antes de ser separados y (b) obtención del polvo con conidios de *M. anisopliae*.

viii. Acondicionamiento final y almacenado: El polvo con conidios obtenido fue pesado, fraccionado e inmediatamente envasado en sobres de aluminio. Estos sobres fueron rotulados y almacenados dentro de bolsas con sílica gel a 4 ± 1 °C (Figura 6.5). Todo este proceso se realizó dentro de la cabina de flujo laminar, en un ambiente seco y en un tiempo corto minimizando el intercambio con el ambiente. Una vez envasado de esta forma, el producto permanece estable (Cherry et al., 1999).

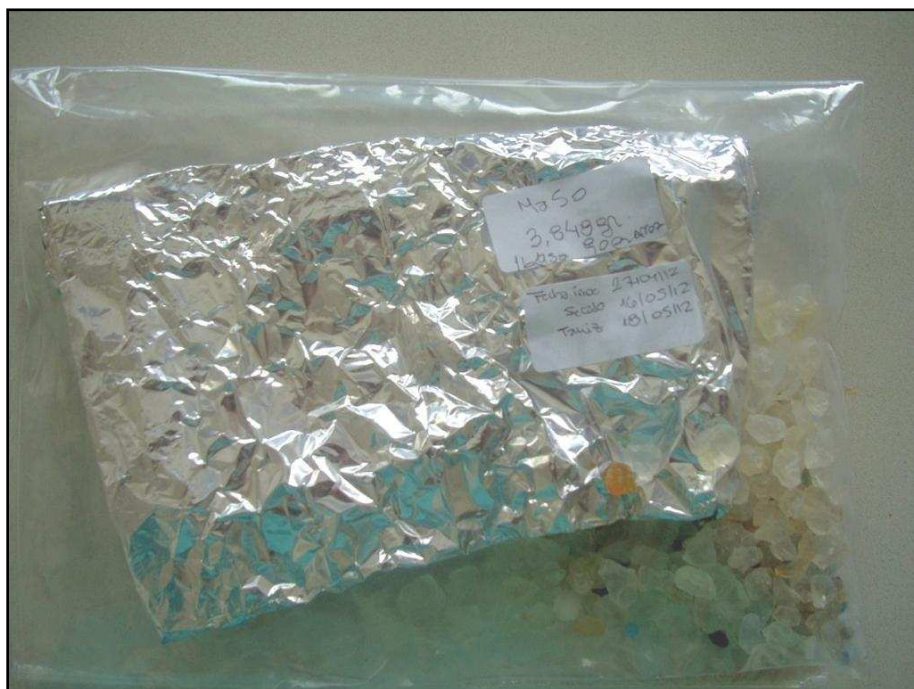


Figura 6.5. Almacenado del polvo con los conidios en sobres de aluminio dentro de una bolsa conteniendo además gel de sílice, sellada y conservado a 4 °C.

ix. Control de humedad: Para estimar el contenido de humedad en el polvo cosechado se modificó el protocolo diseñado por LUBILOSA (www.lubilosa.org). Para ello se secó en una estufa a 85 °C un papel de aluminio durante 1 h. Luego se enfrió el papel a temperatura ambiente (dentro de un recipiente con gel de sílice para que no vuelva a absorber humedad ambiente). Se registró el peso de cada papel y se le colocó una pequeña muestra del polvo de conidios (aproximadamente 0,5 g) al cual se le quiere calcular la humedad. Se pesó el aluminio junto con el polvo y se registró el peso. Luego los sobres con el polvo fueron colocados abiertos

en la estufa nuevamente a 85 °C durante 24h (Rao et al., 2006). Una vez concluido el tiempo de secado, los sobres de aluminio fueron cerrados, enfriados en temperatura ambiente, y pesados nuevamente. El porcentaje de humedad fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ humedad} = ((\text{peso húmedo} - \text{peso seco}) / \text{peso húmedo}) \times 100$$

Donde: Peso húmedo = peso papel + peso conidios húmedos

 Peso seco = peso papel + peso conidios secos

6.2.2. Producción. Ensayos preliminares y puesta a punto

Se realizaron producciones masivas del aislamiento Ma 20. Durante esta etapa se fueron ajustando los tiempos y método de producción. Por otro lado, con el objetivo de probar la cantidad de arroz necesaria para producir en las bolsas se realizó un ensayo donde se produjo esta cepa en dos bolsas con 90 g y dos con 180 g de arroz. Fue registrado el peso del polvo cosechado, el número de conidios en el arroz remanente y en el polvo, el % de humedad del polvo, viabilidad de los conidios y por último, fue calculado el rendimiento como conidios/ g polvo.

6.2.3. Dinámica de producción de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* seleccionados

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los aislamientos seleccionados para ser empleados en el control del picudo del algodonero, los aislamientos de *B. bassiana* (Bb 301 y Bb 302) y de *M. anisopliae* (Ma 20 y Ma 50) fueron producidos masivamente en bolsas conteniendo 90 g de arroz y 45 ml de agua destilada como se describió anteriormente.

Para evaluar el efecto del tiempo de incubación sobre la cosecha de conidios y estimar el tiempo óptimo de incubación, las bolsas inoculadas fueron incubadas a 27 °C durante 11, 18 y 25 días. El experimento fue realizado bajo un diseño completamente al azar factorial. Los tratamientos fueron los 4 aislamientos y los tres tiempos de incubación. Cada tratamiento fue

replicado 3 veces y cada réplica consistió en una bolsa de 90 g. Los tratamientos fueron seleccionados al azar para ser secados a cada uno de los tiempos. El polvo obtenido fue puesto en sobres de aluminio preservados en bolsas con gel de sílice, selladas y guardados a 4 °C, para el cálculo de los distintos parámetros de calidad.

Las variables registradas fueron el peso del polvo obtenido luego del tamizado, el número de conidios por gramo de polvo y el número de conidios en el arroz remanente mediante un recuento en cámara de Neubauer. Luego fue calculada la humedad del polvo, y la viabilidad por el método de recuento de UFC explicado anteriormente. La viabilidad fue calculada apenas tamizado el arroz (tiempo 0) y a los 30 días (tiempo 30).

Por último se realizó un bioensayo inoculando adultos de picudo con una suspensión de 5×10^8 con/ml con los aislamientos producidos para evaluar la virulencia luego de la producción. Se realizaron 3 repeticiones con 20 adultos por repetición. El aislamiento Ma 20 no fue utilizado debido a la baja viabilidad obtenida luego del proceso de producción.

Análisis estadísticos

Los rendimientos (conidios viables/kg arroz) a los distintos tiempos de incubación y entre las distintas cepas fueron comparados utilizando ANOVA para cada aislamiento y tiempos. Los datos fueron transformados a $x' = \log(x)$.

Los porcentajes de viabilidad fueron calculados como:

/ viabilidad = (concentración conidios estimados por UFC / concentración conidios estimados por cámara de Neubauer) x 100

Los porcentajes de viabilidad calculados para los distintos aislamientos y en los distintos tiempos de incubación fueron comparados mediante ANOVA de dos factores (aislamiento x tiempo incubación). Los datos fueron transformados según: $x' = \arcsen(\text{raíz}(p/100))$.

El porcentaje de humedad contenido en los polvos producidos, en los distintos tiempos de incubación y para los distintos aislamientos, fue comparado mediante análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. Con los datos de los conidios remanentes en el arroz luego de la cosecha, se calculó el número de conidios totales producidos y el porcentaje de conidios contenidos en el polvo y en el arroz remanente, respecto al total producidos. El porcentaje de conidios obtenidos en el polvo fue comparado mediante ANOVA de dos factores (aislamiento x tiempo de incubación). El % de pérdida de viabilidad a los 30 días de almacenado se comparó para los distintos aislamientos y los distintos tiempos de incubación utilizando ANOVA de dos factores. El número de picudos adultos muertos en los bioensayos con los polvos de producción fueron comparados mediante ANOVA de un factor.

6.2.4. Desarrollo de formulaciones experimentales del micoinsecticida y evaluación en parcelas a campo

Los aislamientos Bb 23, Bb 301 y Ma 20 seleccionados fueron entregados a la empresa Laboratorios Biagro S.A. para la realización de formulaciones experimentales. El tipo de formulación elegida fue aceite emulsionable, debido a que este tipo de formulaciones muestran varias ventajas como protección de los rayos UV-B, permite mantener la viabilidad de los conidios por mayor tiempo, se evaporan mas lentamente que las formulaciones acuosas, y permite el uso de dispersores hidráulicos convencionales y agua, disminuyendo el costo de traslado y aplicación (Posadas et al., 2012). Una vez recibidas las formulaciones fue evaluada la viabilidad de los conidios utilizando el método de UFC. Para ello se tomó 1 ml de la formulación y se realizaron diluciones 1:10 en tubos de ensayo con Tween 80 (0,05%). Se sembraron 100 μ l de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en placas de Petri conteniendo APG y AMC para *M. anisopliae* y *B. bassiana*, respectivamente.

6.2.5. Ensayos preliminares en condiciones de semicampo

Las formulaciones fueron utilizadas para ensayos de campo para verificar su efectividad y poder iniciar los trámites del registro experimental ante el SENASA del/los micoinsecticidas desarrollados. El aislamiento utilizado para estos ensayos fue Bb 23, debido a que en el momento que se realizaron los ensayos era el único aislamiento seleccionado y formulado. Se pudieron realizar ensayos preliminares en el campo durante las campañas 2009-10 y 2010-11 debido a que en las campañas 2011-12 y 2012-13 no hubo presencia suficiente de picudo por lo que los ensayos planificados no fueron realizados.

Los ensayos fueron realizados en la Estación Experimental Agropecuaria Reconquista (EEA Reconquista, INTA) a cargo de la Ing. Agr. Mariana Sosa. Se realizaron tres tipos de ensayos:

a) Ensayo en condiciones de campo sobre plantas de algodón

Los ensayos fueron realizados en febrero de 2010. Se colocaron 20 plantas por jaula y dentro se liberaron 30 picudos obtenidos de la cría de laboratorio (Capítulo 2, Figura 6.6.). Se aplicaron las formulaciones de conidios con mochila luego de 24 h de liberados los picudos adultos. La dosis aplicada fue 3×10^9 conidios / m². Las observaciones se realizaron a los 14 días de la aplicación. Los adultos fueron recuperados y enviados al Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (IMyZA, INTA) para su confirmación de infección fúngica mediante cámara húmeda. Antes de retirar las jaulas se fumigó con un insecticida químico para eliminar los picudos no colectados. Fueron realizados tres tratamientos y 4 jaulas de 1 m² por tratamiento:

- Bb 23-1: Bb 23 una aplicación
- Bb 23-2: Bb 23 dos aplicaciones
- Testigo: aplicación del coadyuvante únicamente en una solución acuosa.



Figura 6.6. Ensayo en jaulas sobre plantas de algodón.

b) Ensayo en condiciones de semicampo sobre rastrojo

Se realizaron aplicaciones sobre rastrojo. Estos ensayos fueron realizados en julio de 2010 luego de levantado el algodón. Para ello se colocaron las jaulas, y se liberaron 30 picudos obtenidos de la cría de laboratorio en cada una de las jaulas (Capítulo 2, Figura 6.7). Suspensiones de conidios fueron aplicadas con mochila luego de 24 h de liberados los picudos adultos. La dosis aplicada fue 3×10^9 conidios / m^2 (dosis mayor a la utilizada normalmente en el campo correspondería a 3×10^{13} conidios / ha). Se utilizaron 5 jaulas de $1 m^2$ para cada uno de los siguientes tratamientos:

- Testigo: aplicación del coadyuvante únicamente en una solución acuosa.
- Bb 23-1: Bb 23 una aplicación
- Bb 23-2: Bb 23 dos aplicaciones (una cada 15 días)
- Bb 23-3: Bb 23 tres aplicaciones (una cada 15 días)

Fueron realizados tres muestreos (uno cada 15 días). En cada muestreo, se colocó una trampa con feromona en el tratamiento y se colectaron los insectos vivos a las 24h. Se levantó todo el rastrojo que estaba sobre el plástico y se revisó el material en laboratorio. Los individuos muertos fueron colocados en cámara húmeda para confirmar la mortalidad por *B. bassiana*. En el último muestreo fue levantado el testigo además del tratamiento. Luego de finalizado el ensayo, se asperjó con insecticida para evitar cualquier escape y se levantaron las jaulas. Los datos se analizaron con ANOVA de un factor y pruebas *a posteriori* de Tukey ($p < 0,05$).



Figura 6.7. Ensayo en jaulas sobre rastrojo.

6.3. Resultados

6.3.1. Ensayos preliminares de producción del aislamiento Ma 20

Se obtuvo en promedio $1,23 \times 10^{10} \pm 1,66 \times 10^9$ conidios viables/ g polvo, dando un rendimiento promedio de $5,20 \times 10^{11} \pm 2,53 \times 10^{11}$ conidios / kg de arroz ($IC_{95\%}$ [$3,25 \times 10^{11}$; $7,13 \times 10^{11}$]). Se observó una variabilidad muy alta entre estos datos, probablemente como resultado de la poca estandarización en los parámetros utilizados para la producción. Por este motivo, se propuso estudiar los parámetros que influyen en la producción y viabilidad de los conidios (Tabla 6.1).

Al comparar las bolsas con 90 y 180 g de arroz se observó que si bien el número de conidios por g de polvo es similar, el rendimiento (conidios/kg de sustrato sólido) de las bolsas que contenían 180 g de arroz fue la mitad respecto a las bolsas con 90 g. Por otro lado, se observó que el porcentaje de humedad del polvo producido fue mayor y la viabilidad de los conidios fue menor en las bolsas de 180 g (Tabla 6.2). Por este motivo, en los ensayos posteriores fueron utilizadas bolsas de 90 g de arroz.

Tabla 6.1. Resultados preliminares de producción del aislamiento Ma 20.

Tiempo incubación (días)	Nº bolsas cosechadas	Peso polvo cosechado (g)	Conidios viables / g polvo	Rendimiento conidios / kg arroz
13	2	13,64	$1,25 \times 10^{10}$	$9,44 \times 10^{11}$
10	6	11,86	$1,26 \times 10^{10}$	$2,77 \times 10^{11}$
16	4	19,46	$1,26 \times 10^{10}$	$6,81 \times 10^{11}$
14	10	20,90	$1,26 \times 10^{10}$	$2,93 \times 10^{11}$
13	10	25,95	$1,26 \times 10^{10}$	$3,63 \times 10^{11}$
15	10	55,15	$1,26 \times 10^{10}$	$7,72 \times 10^{11}$
10	10	20,38	$9,95 \times 10^9$	$2,25 \times 10^{11}$
10	10	27,44	$1,56 \times 10^{10}$	$4,74 \times 10^{11}$
13	12	70,26	$9,94 \times 10^9$	$6,46 \times 10^{11}$

Tabla 6.2. Parámetros de producción en bolsas conteniendo 90 y 180 g de arroz.

Cantidad arroz (g)	g polvo / kg arroz (DE)	Contenido humedad (✓) (DE)	Conidios/ g polvo (DE)	Viabilidad (DE)	Rendimiento (conidios/kg arroz) (DE)
90	90,4 (28,84)	8,7 (4,1)	$2,68 \times 10^{10}$ ($0,18 \times 10^{10}$)	85,07 (11,02)	$2,39 \times 10^{12}$ ($0,61 \times 10^{12}$)
180	38,5 (9,85)	19,3 (11,7)	$3,17 \times 10^{10}$ ($0,89 \times 10^{10}$)	66,00 (8,49)	$1,18 \times 10^{12}$ ($0,03 \times 10^{12}$)

6.3.2. Dinámica de producción de los aislamientos seleccionados contra el picudo

Al evaluar todos los aislamientos, no se observaron diferencias en el rendimiento a los distintos tiempos de incubación para ninguno de los aislamientos evaluados (Ma 20: $F(2, 6) = 2,5$; $p < 0,16$; Ma 50 $F(2, 6) = 4,7$; $p < 0,06$; Bb 301: $F(2, 6) = 1,11$; $p < 0,39$; Bb 302: $F(2, 6) = 4,58$; $p < 0,06$) (Figura 6.8). Sin embargo, se obtuvieron diferencias entre los aislamientos, donde los de *B. bassiana* tuvieron un mayor rendimiento que los de *M. anisopliae*. El aislamiento que registró menor rendimiento fue Ma 20 con $1,31 \pm 0,75$ conidios $\times 10^{11}$ / kg arroz y el mayor rendimiento lo tuvo el aislamiento Bb 301 con $4,24 \pm 1,97$ conidios $\times 10^{12}$ / kg arroz (ANOVA, $F(3, 32) = 28,97$; $p < 0,01$) (Figura 6.9).

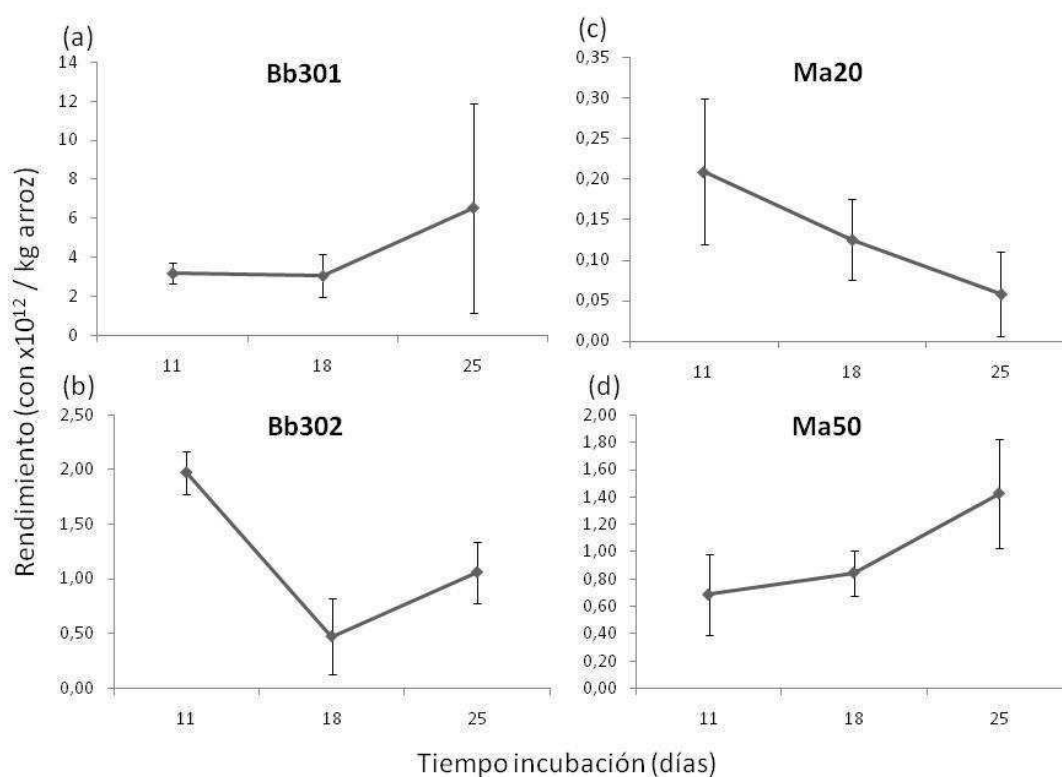


Figura 6.8. Rendimiento (conidios/kg arroz) en los distintos tiempos de incubación de las bolsas de producción para los aislamientos (a) Bb 301, (b) Bb 302, (c) Ma 20, (d) Ma 50.

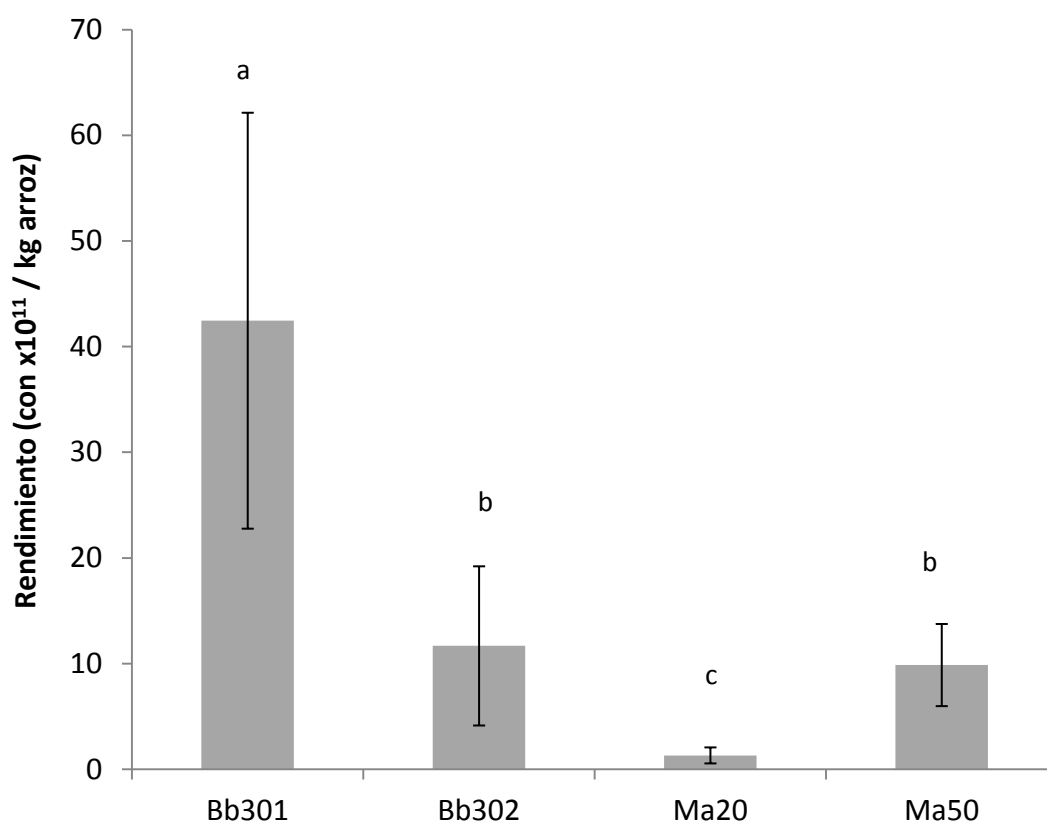


Figura 6.9. Rendimiento promedio (conidios viables/kg arroz) de cada uno de los aislamientos. Iguales letras sobre las barras indica que no hay diferencia entre las medias (ANOVA, test de Tukey $p < 0,05$).

La viabilidad de los conidios no disminuyó con el tiempo de incubación, sin embargo se observaron diferencias significativas entre los distintos aislamientos ($F(3,23) = 16,4; p < 0,01$). El aislamiento Bb 301 mostró 100% viabilidad de conidios, mientras que los aislamientos Ma 50 y Bb 302 tuvieron 54 y 57% de viabilidad, respectivamente. El aislamiento más susceptible fue Ma 20 donde la viabilidad de conidios fue sólo el 20% (Figura 6.10).

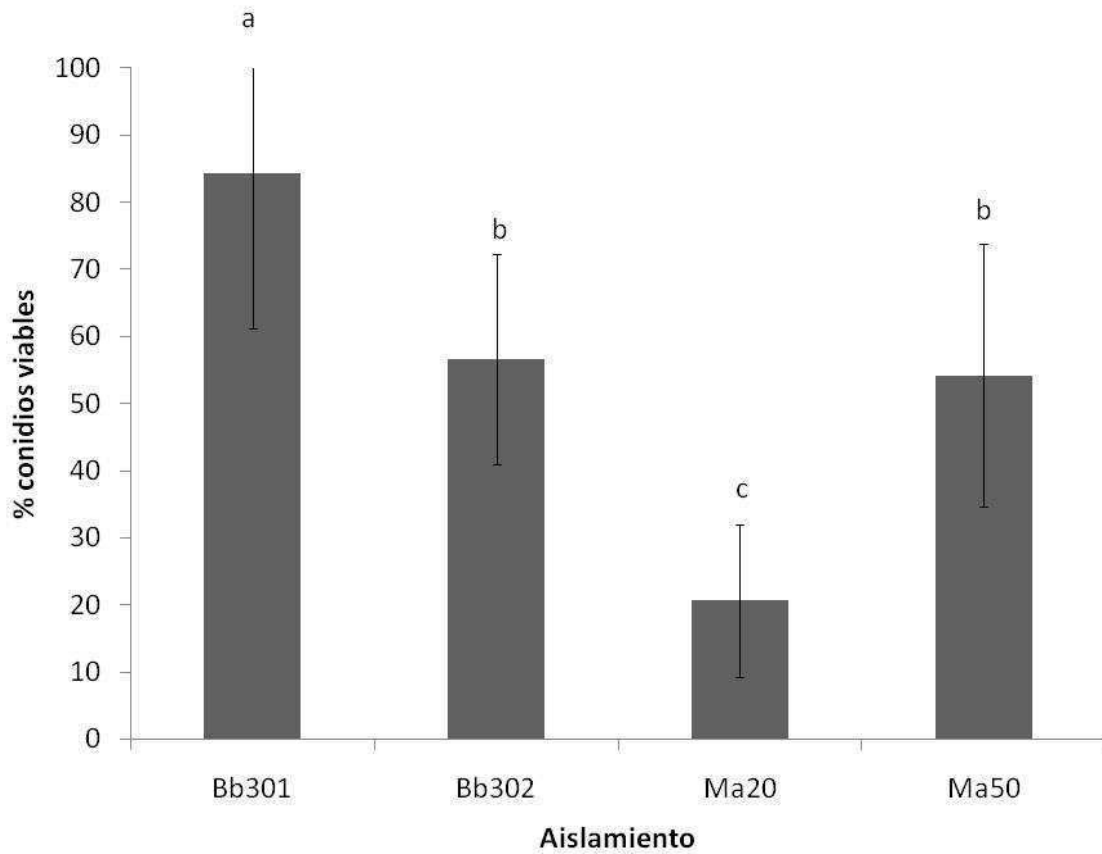


Figura 6.10. Porcentaje de conidios viables de los polvos producidos para los distintos aislamientos. Iguales letras sobre las barras indica que no hay diferencia entre las medias (ANOVA, test de Tukey $p < 0,05$).

El porcentaje de humedad promedio de los productos fue $11,73 \pm 5,83\%$. No hubo diferencias entre los distintos tiempos de incubación para ninguno de los aislamientos. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los aislamientos en el / humedad ($H(3,35) = 7,92$; $p = 0,048$) (Figura 6.11).

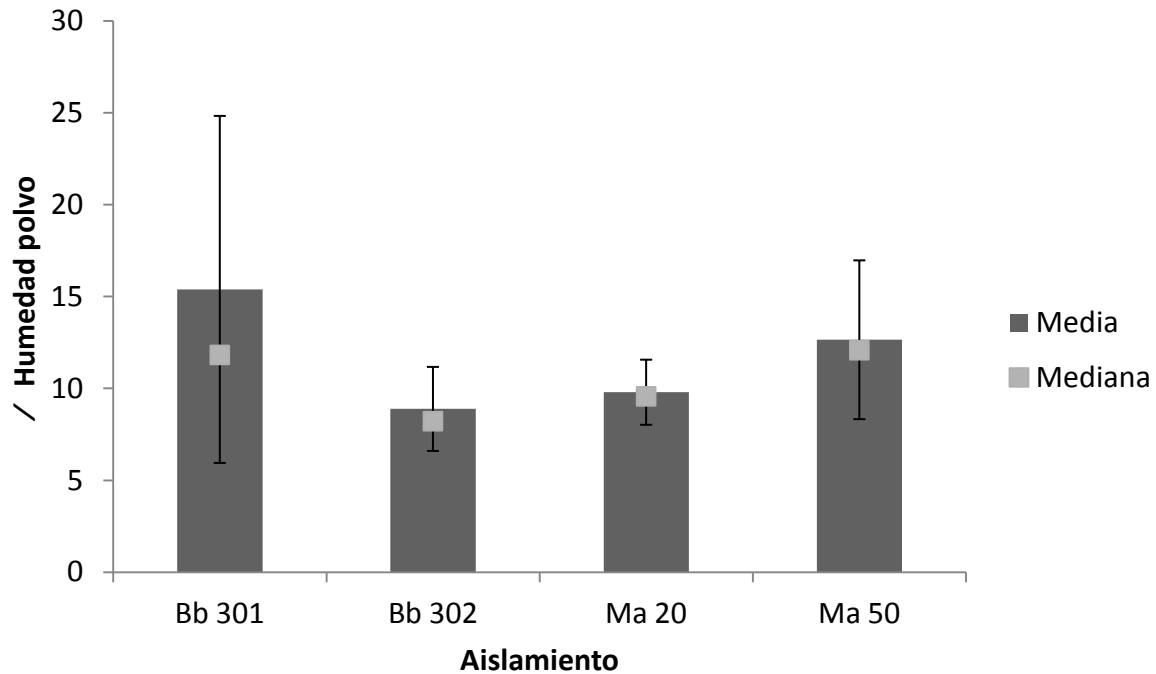


Figura 6.11. Porcentaje de humedad contenida en los polvos cosechados para los distintos aislamientos. Media, mediana y desvío estándar.

Los porcentajes de conidios remanentes en el arroz para los distintos aislamientos fueron los siguientes: Bb 301: $24,68 \pm 5,93/$; Bb 302: $22,40 \pm 5,70/$; Ma 20: $43,15 \pm 11,40/$; y Ma 50: $47,03 \pm 9,57/$. No se encontraron diferencias en el $\%$ de conidios contenidos en el polvo entre los tiempos de incubación ($F(2, 24) = 1,37$; $p < 0,27$), pero si entre los distintos aislamientos ($F(3, 24) = 5,64$; $p < 0,004$), donde los de *B. bassiana* tuvieron un menor porcentaje de conidios remanentes en el arroz (Figura 6.12).

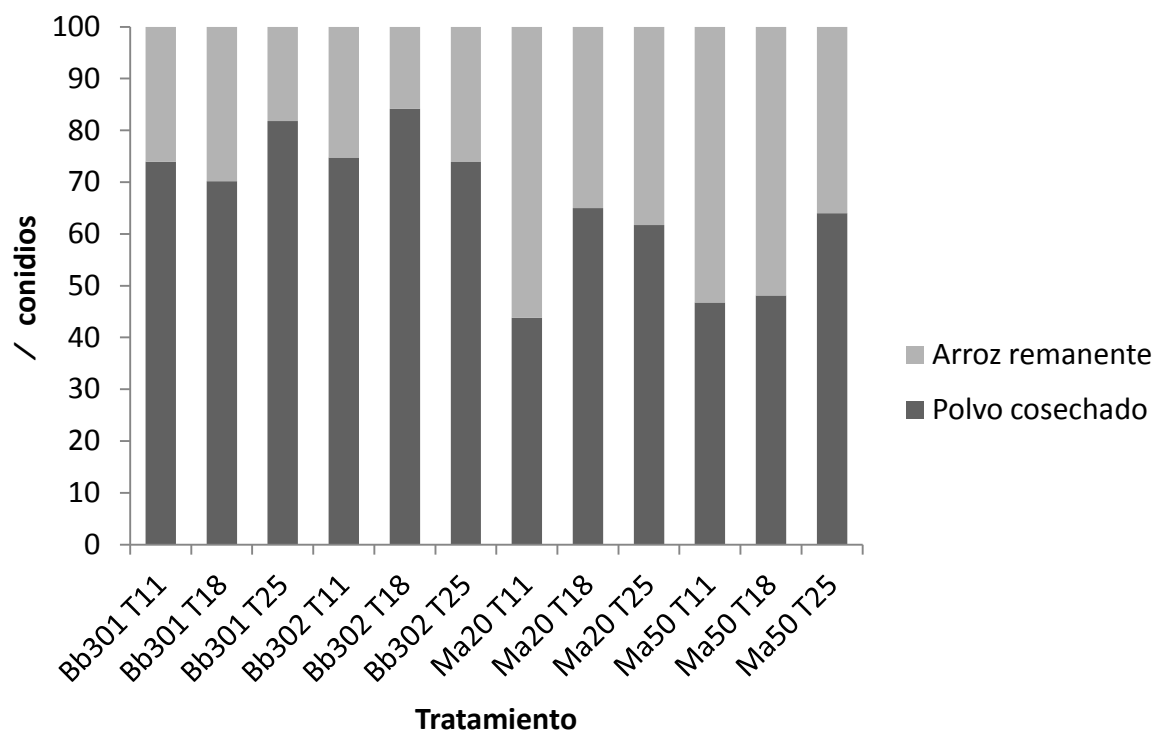


Figura 6.12. Porcentaje de conidios en el polvo cosechado y en el arroz remanente para los distintos tratamientos.

El porcentaje de pérdida de viabilidad a los 30 días de almacenado a 4 °C fue 23,41/ en promedio y esta no difiere significativamente para ninguno de los aislamientos ($F(3, 23) = 2,49$; $p < 0,09$), ni en los tiempos de incubación de las bolsas ($F(2, 23) = 0,35$; $p < 0,71$). Probablemente esta falta de diferencia estadística se debe a la variabilidad en los resultados, donde algunas de las muestras no mostraron pérdidas en la viabilidad (Bb 301 T 18, Bb 302 T 25), mientras que otras disminuyeron más del 40/ los conidios viables (Ma 20 T18, Ma 50 T11). El aislamiento Ma 20 T25 tuvo una viabilidad inicial muy baja, y esta se mantuvo a los 30 días.

Tabla 6.3. Conidios viables por UFC realizado luego del tamizado y a los 30 días de almacenado a 4 °C.

Aislamiento	Tiempo de incubación	T0 (UFC) con x10 ⁹ /g polvo	T30 (UFC) con x 10 ⁹ /g polvo	/ disminución viabilidad
Bb301	T11	102,71 ± 5,38	84,00 ± 14,00	18,21
Bb301	T18	62,22 ± 19,82	73,67 ± 6,11	0,00
Bb301	T25	123,26 ± 75,18	76,50 ± 24,75	37,94
Bb302	T11	48,40 ± 4,32	43,21 ± 11,91	10,71
Bb302	T18	20,53 ± 9,83	18,18 ± 4,77	11,41
Bb302	T25	14,35 ± 1,84	16,08 ± 5,08	0,00
Ma20	T11	4,35 ± 1,61	2,64 ± 0,68	39,38
Ma20	T18	2,28 ± 0,63	1,21 ± 0,20	46,78
Ma20	T25	0,84 ± 0,26	1,07 ± 0,72	0,00
Ma50	T11	16,48 ± 3,19	9,69 ± 4,29	41,22
Ma50	T18	10,74 ± 2,66	7,07 ± 0,93	34,19
Ma50	T25	15,56 ± 4,88	11,57 ± 2,10	25,64

6.3.3. Bioensayos con los aislamientos producidos

Respecto a los bioensayos, no se observaron diferencias en la virulencia dentro del mismo aislamiento de *B. bassiana* con distintos tiempos de incubación ($F_{Bb\ 301}(2,6) = 4,20$; $p < 0,07$; $F_{Bb\ 302}(2,6) = 3,88$; $p < 0,08$). Los porcentajes de mortalidad obtenidos para Bb 301 y Bb 302 fueron $88,33 \pm 8,66/$ y $82,78 \pm 10,93/$, respectivamente. Respecto a Ma 50, se encontró un mayor / mortalidad ($96,67 \pm 5,77/$) con el polvo obtenidos de 18 días de incubación ($F_{Ma\ 20}(2, 6) = 10,5$; $p < 0,01$) (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Porcentajes de mortalidad promedios de adultos de picudo del algodnero tratados con una suspensión de 5×10^8 conidios / ml de los polvos producidos.

Aislamiento	Tiempo incubación	/ mortalidad	(Mín-Máx)
Bb301	11	80,00	(70-85)
	18	90,00	(85-95)
	25	95,00	(90-100)
Bb302	11	93,33	(90-95)
	18	75,00	(65-85)
	25	80,00	(70-90)
Ma50	11	80,00	(75-85)
	18	96,67	(90-100)
	25	83,33	(80-85)

6.3.4. Formulaciones experimentales

Fueron evaluados los parámetros de calidad de 7 lotes distintos de las formulaciones realizadas por la empresa Laboratorios Biagro S.A. con los aislamientos seleccionados para el picudo del algodnero. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5. Datos de diferentes lotes formulados con los aislamientos Bb 23, Bb 301 y Ma 20. Conidios por ml de formulación y conidios totales en la formulación.

Aislamiento	Neubauer (conidios/ml)	UFC (conidios/ml)	Viabilidad (/)	Observaciones
<i>Beauveria bassiana</i>				
Bb 23	-	$6,67 \times 10^8$	-	Utilizado en el ensayo en parcelas
Bb 23	-	$6,98 \times 10^8$	-	Utilizado en los ensayos en jaulas

Bb 301	$1,65 \times 10^9$	$3,70 \times 10^8$	22,42	
Bb 301	$1,20 \times 10^8$	$1,81 \times 10^7$	15,08	
Bb 301	$1,92 \times 10^8$	$1,94 \times 10^8$	101,04	
Bb 301	$2,55 \times 10^9$	$1,59 \times 10^9$	62,35	
<i>Metarhizium anisopliae</i>				
Ma 20	$3,50 \times 10^7$			Contaminación con <i>Aspergillus flavus</i> .
Ma 20	$1,20 \times 10^8$	$3,63 \times 10^7$	30,25	
Ma 20	$5,00 \times 10^8$	$6,18 \times 10^7$	12,35	Formulado de conidios producidos en el laboratorio
Ma 20	$9,25 \times 10^8$	$8,00 \times 10^8$	86,49	
Ma 20	$5,25 \times 10^8$	$1,22 \times 10^8$	23,14	
Ma 20	$5,55 \times 10^8$	$1,72 \times 10^8$	30,90	
Ma 20	$8,75 \times 10^8$	$1,40 \times 10^8$	15,94	

6.3.5. Evaluación de las formulaciones en el campo

a) Ensayos en jaulas sobre plantas de algodón

Luego de realizado el ensayo, se encontraron complicaciones para recuperar los picudos liberados, debido a que las jaulas no tenían piso y los mismos se buscaron entre las plantas y el suelo. Se lograron obtener únicamente entre un 8 y 15% del total. En Bb 23-1 se observó mayor número de picudos muertos, sin embargo no fue posible confirmar la presencia de *B. bassiana* en ninguno de los cadáveres (Tabla 6.6). A pesar de no poder realizar una evaluación de los resultados obtenidos, estos ensayos resultaron importantes para poder planificar ensayos en campo para las futuras campañas, teniendo en cuenta los inconvenientes que se presentan al trabajar en el campo.

Tabla 6.6. Resultados obtenidos en ensayos en campo sobre plantas de algodón dentro de jaulas.

Tratamientos	Número insectos muertos/ jaula	Total recuperados
Bb 23 - 1	3,31	20/120
Bb 23 - 2	1,75	21/120
Testigo	1,63	10/120

b) Ensayos en jaulas sobre rastrojo

Teniendo en cuenta los inconvenientes presentados en los ensayos previos, se realizaron ensayos sobre el rastrojo, cambiando la forma de evaluación. En estos ensayos se colocó una bolsa en el piso y por encima el rastrojo, lo cual permitió levantar los insectos en forma más efectiva al finalizar el muestreo. Se encontraron diferencias con el testigo pero no entre tratamientos ($F(3,16) = 14,38$; $p < 0,01$). Sin embargo, nuevamente fue difícil recuperar todos los insectos liberados que estaban muertos ya que se confundían con el rastrojo (Tabla 6.7).

Se observa que a medida que pasa el tiempo (tratamientos 1, 2 y 3) el porcentaje de picudos recuperados fue disminuyendo (Tabla 6.7). Además, los picudos no se capturaron en las trampas con feromona colocadas en cada jaula. Basado en estos resultados y observación en el campo, se puede pensar que se murieron y probablemente fueron comidos por otros insectos, como hormigas predadoras. Por otro lado, los picudos que venían de la cría en condiciones de abrigo y comida *ad libitum*, al colocarlos sobre el rastrojo sin comida pueden no haber sobrevivido a estas condiciones.

Tabla 6.7. Resultados obtenidos en ensayos en campo sobre rastrojo de algodón dentro de jaulas.

Tratamientos	/ Picudos recuperados (Máx – Mín)	/ Picudos muertos con <i>B. bassiana</i> (Máx – Mín)
Bb 23 – 1	40,0 (13,3 - 63,3)	42,75 (25 - 50) (N = 60) a
Bb 23 – 2	27,3 (20 - 36,7)	49,55 (28,6 - 63,6) (N = 41) a
Bb23 – 3	16,7 (3,3 - 26,7)	59,79 (37,5 – 100) (N = 25) a
Testigo	24,0 (6,7 – 53,3)	0 (N = 36)b

* Iguales letras indica que no hay diferencias entre las medias (ANOVA F(3,16) = 14,38; P<0,001)

6.4. Discusión

6.4.1. Producción

En este capítulo se evaluaron distintos parámetros de producción de conidios de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* seleccionados para el picudo del algodón. Resultados preliminares mostraron que la producción en bolsas con arroz con un tiempo de incubación entre 10 y 16 días y el tiempo de secado de 48 h es posible para estos aislamientos. Sin embargo, se observó una gran variabilidad en el rendimiento entre las distintas producciones. Este resultado coincide con lo observado por Cherry et al. (1999) donde obtuvieron una alta variación en la producción de conidios de una cepa de *M. anisopliae* comparando durante tres años. Encontrar que parámetros afectan esta variación podría ser importante para tener una producción masiva homogénea en el momento de comercializar un producto basado en conidios de estas especies fúngicas.

Al probar las bolsas con 90 y 180 g de arroz, se observó un mayor rendimiento en las bolsas con menos cantidad de arroz, esto podría deberse a una mayor dificultad en el secado en las bolsas con más cantidad de sustrato, dando como resultado un mayor contenido de humedad. La humedad retenida en los conidios dificulta la extracción por tamizado y además afecta la viabilidad (Horaczek y Viernstein, 2004).

Respecto al tiempo de incubación, no se encontraron diferencias en el rendimiento, viabilidad y porcentaje de humedad de conidios a los distintos tiempos evaluados. En las condiciones de producción que se utilizó en este trabajo, los nutrientes son limitados y el hongo crece inicialmente en forma de micelio aprovechando los nutrientes disponibles. Una vez que estos van disminuyendo se produce la esporulación y está posiblemente se ve limitada por nutrientes y oxígeno, llegando a un máximo de producción. Por lo tanto, al aumentar el tiempo de incubación no se obtuvo un aumento en el rendimiento (cantidad de conidios por gramo de arroz). Posada-Flórez (2008) no encuentran una relación clara entre el período de incubación y la cosecha de conidios, sin embargo sugieren que los conidios podrían germinar durante ese período y obtener una pérdida de viabilidad, encontrándose un período óptimo entre los 10 y 20 días. Otros trabajos encontraron que la longevidad de conidios fue máxima cuando los conidios fueron tamizados a los 10 días luego de la inoculación (Hong et al., 2000). En este trabajo no se encontraron diferencias en el tiempo, por lo que se sugiere incubar durante 10 días acelerando el proceso productivo.

Por otro lado, se observa que la producción de conidios en términos de rendimiento y viabilidad depende del aislamiento. En general, los valores de rendimiento obtenidos para los aislamientos de *B. bassiana* fueron mayores a los de *M. anisopliae*. Estas diferencias entre ambos géneros de hongos probablemente se encuentren asociadas a la diferencia en tamaños de los conidios. Los conidios de *B. bassiana* presentan un diámetro de 1,5 a 3,5 μm , mientras que los de *M. anisopliae* presentan un diámetro de 9 a 11 μm (Humber, 2000). Otros autores, en trabajos con hongos entomopatógenos, hallaron diferencias significativas en los valores de producción de estos dos géneros, y en general esta diferencia también fue atribuida al tamaño

diferencial de los conidios (Dorta et al., 1996; Arzumanov et al., 2005; Kassa et al., 2008). De acuerdo con estos resultados, generalmente las cepas de *B. bassiana* presentan un mejor rendimiento (conidios / kg arroz) que las de *M. anisopliae* y que además, entre las cepas de una misma especie también existen diferencias de rendimiento. Kassa et al. (2008), estudiaron la producción masiva de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y encontraron que la producción de conidios y la viabilidad dependen del aislamiento fúngico independientemente de los distintos métodos de producción utilizada. La producción de conidios de *B. bassiana* ha sido desarrollada en varios países con un alto nivel de eficiencia de producción. Bartlett y Jaronski (1988) y Feng et al. (1994) reportaron $7 - 8 \times 10^{12}$ conidios / kg arroz. La máxima productividad registrada en nuestro trabajo fue con Bb 301 de $4,24 \pm 1,97$ conidios $\times 10^{12}$ / kg arroz, la cual a pesar de ser un poco menor se encuentra en el mismo orden.

El secado podría ser una de las etapas claves de la producción, ya que durante este proceso muchos conidios podrían perder la viabilidad (por ejemplo el aislamiento Ma 20 donde sólo el 20,6% de los conidios cosechados estaban viables). El tiempo de secado es importante para preservación de conidios. En el caso de *M. anisopliae*, un secado rápido entre 30 y 35 °C es crítico para preservar los conidios (Bailey y Rath, 1994; Horaczek y Viernstein, 2004). El límite de disecación y tolerancia a la temperatura son las restricciones más importantes en los métodos de secado de hongos entomopatógenos. Se ha demostrado que el contenido de humedad inicial del polvo de conidios y la velocidad de secado cuando son producidos en sustrato sólido influyen en la vida media de los conidios de *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Hedgecock et al. 1995). Idealmente, un contenido de humedad de 5% sería conveniente para conservación de los conidios (Bateman, 1995), sin embargo, no se consiguió llegar a esos valores en este trabajo y es necesario seguir ajustando el método a utilizar.

En relación con los conidios contenidos en el arroz remanente, se encontró que para ambas especies fúngicas hubo una retención de conidios en el sustrato, siendo mayor el porcentaje de conidios remanentes para los aislamientos de *M. anisopliae*. Para realizar productos basados en este tipo de producción, sería importante hallar un método de extracción

más efectivo que permita obtener más conidios sin aumentar los residuos del sustrato. Por otro lado, el arroz remanente puede ser utilizado como inóculo en un proceso productivo.

El sustrato en el cuál se producen los hongos entomopatógenos también parece influir en el rendimiento. Espinel et al. (2008) evaluaron el rendimiento de *B. bassiana* en avena, arroz y maíz, y concluyeron que el sustrato de producción afecta significativamente al rendimiento de las cepas fúngicas. Bhanu Prakash et al. (2008), desarrollaron una aproximación matemática para la optimización del proceso de fermentación utilizando tres sustratos, arroz, cebada y sorgo, variando el pH, el contenido de humedad y la concentración de extracto de levadura (fuente de nitrógeno y vitaminas), factores que podrían ser importantes en la producción de conidios de *M. anisopliae*. Las condiciones óptimas obtenidas por estos investigadores para la producción de conidios en sustrato sólido fueron producir en arroz, el pH de 7,01, contenido de humedad de 22,24% y concentración de extracto de levadura de 1,45 g. Estas variables deberían ser evaluadas con los aislamientos de *M. anisopliae* seleccionados en esta tesis.

Por último, a pesar de las diferencias encontradas en la producción de los distintos aislamientos, fue posible mantener la virulencia contra el picudo del algodnero. A diferencia de esto, Arcas et al. (1999) encontraron que la metodología utilizada para la producción masiva de hongos entomopatógenos afecta marcadamente su actividad bioinsecticida. La retención de una alta viabilidad y virulencia de los conidios de los hongos entomopatógenos durante el almacenamiento y posterior aplicación, es esencial para un control biológico efectivo de insectos en el campo.

6.4.2. Formulación

Durante el proceso de formulación, se observó que existe una gran pérdida de la viabilidad. Esto lleva a productos con dosis menores a las necesarias para disminuir la población de la plaga. Esta disminución de la viabilidad puede estar dada por el proceso que se utiliza en

la producción y formulación, tanto como por los compuestos que se adicionan al producto final para mantener y aplicar el mismo.

La vida media y propiedades físicas y biológicas de la formulación son temas importantes en las formulaciones comerciales. Las formulaciones deben mantenerse estables por al menos un año y preferentemente durante 18 meses para comercialización (Batta, 2003).

Daoust et al. (1983) encontraron que aceites de distintos tipos, en una forma concentrada, tienen efectos negativos sobre la viabilidad de conidios de *M. anisopliae* durante el almacenamiento a ciertas temperaturas y humedades relativas. Por otro lado, los surfactantes utilizados pueden tener efecto negativo sobre los conidios, y éste debe ser determinado empíricamente mediante ensayos de compatibilidad con las distintas especies fúngicas, más aun, entre cepas de una misma especie (Jackson et al., 2010). Experimentos adicionales con la formulación de estos hongos son necesarios para ser utilizados en el manejo del picudo del algodonero. Por ejemplo, la viabilidad del hongo en la formulación a un amplio rango de temperaturas de almacenado y el efecto de los coadyuvantes sobre la viabilidad de los conidios.

6.4.3. Evaluación a campo

Se observó una disminución de picudos en el campo tanto en los ensayos sobre plantas como sobre rastrojo dentro de jaulas. Sin embargo, problemas en el desarrollo de los ensayos llevaron a la pérdida de insectos experimentales, debido a escapes, predadores y dificultad para encontrar los insectos muertos sobre el material. Estos ensayos son considerados como preliminares para diseñar los ensayos a futuro una vez que se tenga el formulado del aislamiento seleccionado. Estudios desarrollados en Texas (EEUU) obtuvieron un aumento en la producción de algodón al tratar con Naturalis-L (un micoinsecticida desarrollado a base de conidios de *B. bassiana*), y concluyen que el uso de este micoinsecticida en áreas de producción de algodón al inicio de la temporada (donde se encuentran los adultos hibernantes), podría

ayudar a reducir la aplicación de insecticidas químicos, especialmente en áreas donde el picudo aparece esporádicamente (Wright y Chandler, 1992; Wright, 1993).

En el presente trabajo sólo se pudo realizar ensayos en campo con aislamientos de *B. bassiana*, a pesar de que esta especie resultó menos virulenta para el picudo del algodón respecto a *M. anisopliae*. Wright y Chandler (1992) evaluaron la eficacia de una formulación de *B. bassiana* sobre poblaciones de picudo en el campo. Estos autores hallaron una mortalidad significativa, además de una mejora en el rendimiento de la fibra cuando el micoinsecticida es aplicado contra adultos hibernantes de picudo.

La especie *M. anisopliae* aun no se encuentra registrada en el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), por lo cual no es posible aun la experimentación en el campo con la misma.

Conclusiones generales

En este trabajo se seleccionaron aislamientos de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* para ser utilizados en el control de *A. grandis*. Para la selección de los aislamientos se tuvo en cuenta tanto la virulencia de los aislamientos como los efectos subletales que producen sobre el picudo del algodonero. Asimismo, fueron evaluadas distintas características de los aislamientos importantes para su aplicación como micoinsecticidas, como tolerancia a altas temperaturas, compatibilidad con los insecticidas químicos, y la capacidad de ser producidos masivamente y formulados. Por último, se realizaron algunas evaluaciones en el campo.

Uno de los resultados importantes encontrados en esta Tesis fue que los aislamientos de *M. anisopliae* resultaron más virulentos para *A. grandis*, obteniéndose mayor mortalidad, menor concentración letal media y menor tiempo de supervivencia media con esta especie fúngica. Además, estos aislamientos produjeron efectos subletales sobre la alimentación y la oviposición. Respecto a la alimentación, se encontró que las hembras tratadas con *B. bassiana* y con *M. anisopliae* disminuyeron el daño sobre los pimpollos de algodón, además que tuvieron una menor ganancia de peso. Con respecto a la oviposición, las hembras tratadas con *M. anisopliae* pusieron menor cantidad de huevos. Las hembras de *A. grandis* concentran el máximo esfuerzo reproductivo al inicio de la vida, obteniéndose un pico de oviposición entre los 15 y 19 días. En el caso de hembras tratadas con *M. anisopliae*, este pico no se obtiene debido a la disminución en la oviposición e incremento de la mortalidad. Además, se observa una transmisión vertical del hongo patógeno, por lo cual, no todos los huevos puestos por las hembras son viables, disminuyendo aún más la descendencia producida por esa hembra. Estos resultados son importantes, debido a que a pesar de que el hongo no produce la mortalidad

instantánea de la plaga, en el tiempo de incubación de la enfermedad, el daño sobre el algodón y la descendencia disminuye, lo cual podría reducir el rápido crecimiento poblacional que ocurre en el campo durante la temporada en que se realiza el cultivo de algodón.

Por otro lado, se pudo probar que los aislamientos de *M. anisopliae* son más adecuados para ser utilizados en un micoinsecticida, debido que registraron mayor tolerancia a altas temperaturas. Las altas temperaturas y radiación solar son los principales factores limitantes para el uso de hongos entomopatógenos bajo condiciones de campo. Las temperaturas altas pueden desorganizar la membrana de las células fúngicas y causar daños por la desnaturalización de proteínas y en el ADN por pérdida de bases por depurinación (Li y Feng, 2009). Daños similares pueden ser ocasionados por radiación solar UV-B. Por lo tanto, no sólo la tolerancia a altas temperaturas debe evaluarse cuando se quiere seleccionar una cepa como agente de biocontrol, sino que también debe estudiarse la tolerancia a radiación UV-B. En consecuencia, se debe destacar la importancia que tienen las formulaciones de micoinsecticidas con el agregado de protectores adecuados así como el momento de su aplicación en el campo.

Otro hallazgo de estas Tesis fue que los aislamientos de *M. anisopliae* seleccionados fueron más compatibles con los insecticidas químicos piretroides utilizados en el campo contra el picudo del algodnero, y el uso conjunto de los conidios del hongo con el insecticida tuvieron un efecto aditivo sobre la mortalidad de los adultos. Estos resultados permiten concluir que el uso de *M. anisopliae* combinado con un método de control químico, utilizados adecuadamente dentro de un programa de MIP, puede ayudar a disminuir la cantidad de insecticidas químicos aplicados, disminuyendo la contaminación que éstos producen.

Finalmente, los datos de producción masiva mostraron que con los aislamientos de *M. anisopliae* se obtuvieron menores rendimientos y menor viabilidad de los conidios respecto a *B. bassiana*. Si bien esta especie es más dificultosa para obtener grandes cantidades de conidios, en este trabajo se demostró que son necesarias menores concentraciones para producir mortalidad de los adultos de *A. grandis*, y además, tienen una mayor tolerancia a los factores externos, tales como la temperatura y productos químicos, respecto a los aislamientos de *B. bassiana*. Sin embargo, es necesario continuar estudiando qué factores afectan la viabilidad de los conidios durante el proceso de producción y encontrar un mejor método de extracción de los conidios del arroz utilizado como sustrato.

En conclusión, según los resultados de laboratorio, los aislamientos de *M. anisopliae*, Ma 20 y Ma 50, son candidatos para ser utilizados en el control de *A. grandis*. Sin embargo, aún no fue posible la experimentación en el campo con aislamientos de *M. anisopliae*, debido a que esta especie no se encuentra registrada en el SENASA. Es necesario continuar trabajando en la producción y formulación de estos aislamientos, tanto como poder obtener el permiso de SENASA para poder evaluar la eficiencia de estos aislamientos en el campo.

Bibliografía

- Adane, K., Moore, D., Archer, S.A., 1996. Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *Journal of Stored Products Research*. 32 (2): 105–113.
- Alizadeh, A., Samih, M.A., Khezri, M., Riseh, R.S., 2007. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. *International Journal of Agriculture and Biology*. 9 (1): 31–34.
- Alston, D.G., Rangel, D.E.N., Lacey, L.A., Golez, H.G., Kim, J.J., Roberts, D.W., 2005. Evaluation of novel fungal and nematode isolates for control of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Biological Control*. 35: 163–171.
- Alves, S.B., 1986. Controle microbiano de insetos. Editora Manole. 407 p.
- Alves, S. B., Moino Jr., A., Almeida, J. E. M., 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In Controle microbiano de insetos (Alves, S. B. ed.) 2nd ed. FEALQ, Sao Paulo, pp. 697-701.
- Alzogaray, R.A., Zerba, E.N., 1997. Incoordination, paralysis and recovery after pyrethroid treatment on nymphs III of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 92(3): 431-35.
- Andersen, P., Borgan, O., Gill, R., Keiding, N., 1993. Statistical models based on counting processes. Springer.
- Anderson, D.M., 1968. Observations on the Pupae of *Anthonomus grandis grandis* Boheman and *A. grandis thurberiae* Pierce (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 61(1): 125 -129.
- Anderson, T.E., Roberts, D.W., 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *Journal of Economic Entomology*. 76: 1437-1441.
- Anderson, T.E., Hajek, A.E., Roberts, D.W., Preisler, H.K., Robertson, J.L., 1989. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. *Journal of Economic Entomology*. 82: 83-89.
- Arcas, J.A., Díaz, B.M., Lecuona, R.E., 1999. Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *Journal of Biotechnology*. 67: 151-158.
- Arzumanov, T., Jenkins, N., Roussos, S., 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Process Biochemistry*. 40: 1037 – 1042.

- Asi, M.R., Vashir, M.H., Afzal, M., Ashfaq, M., Sahi, S.T., 2010. Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticides. *Pakistan Journal of Botany*. 42(6): 4207-4214.
- Bailey, L.A., Rath, A.C., 1994. Production of *Metarhizium anisopliae* spores using nutrient-impregnated membranes and its economic analysis. *Biocontrol Science and Technology*. 4: 297 – 307.
- Bartlett, M.C., Jaronski, S.T., 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. En: Burges H.D. (ed.) *Microbial control pests and plant diseases*. Academic Press, New York, pp. 60-85.
- Bateman, R.P., Lomer, G., Lomer, C.J., 1995. Formulation and application of mycopathogens for locust and grasshopper control. *LUBILOSA Technical Bulletin*. 4: 67.
- Batta, Y.A., 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection*. 22: 415-422.
- Baverstock J., Roy H., Clark S., Alderson P.G., Pell J.K., 2006. Effect of fungal infection on the reproductive potential of aphids and their progeny. *Journal of Invertebrate Pathology*. 91: 136-139.
- Baverstock, J., Roy, H.E., Pell, J.K., 2010. Entomopathogenic fungi and insect behavior: from unsuspecting hosts to targeted vectors. *Biocontrol*. 55: 89-102.
- Bennettova B., Fraenkel G., 1981. What determines the number of ovarioles in a fly ovary? *Journal of Insect Physiology*. 27 (6): 403-410.
- Bhanu Prakash, G.V.S., Padmaja, V., Siva Kiran, R.R., 2008. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. 99: 1530-1537.
- Bidochka, M.J., Leger, R.J., Joshi, L., Roberts, J.L., 1995. The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycological Research*. 99: 403-406.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. 101(4): 512-530.
- Blanford, S., Thomas, M.B., 2001. Adult survival, maturation and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78: 1-8.

- Bleicher E., Quintela E.D., Oliveira I.S.R., Quinderé A.W., 1992. Efeito do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E inseticidas na população do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boh. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 23(1): 131-133.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycosis in arthropod hosts. In: *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. G. T. Cole y H. C. Hoch (Eds.), Plenum Press, New York, pp 101-127.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., 1998. Principles of insect pathology. Latge, J.P., Boucias, D.G. (co-editores). Kluwer Academic Publishers, Boston. 537 p.
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2001. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*. 74: 734-739.
- Burke, H.R., 1959. Morphology of the reproductive systems of the cotton boll weevil (Coleoptera, Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 52: 287-294.
- Burke, H.R., Clark, W.E., Cate, J.R., Fryxell, P.A., 1986. Origin and dispersal of the boll weevil. *Bulletin of the Entomological Society of America*. 32: 228-238.
- CASAFE, 2007. Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. Cámara de sanidad agropecuaria y fertilizantes. Tomo I. 1064 p.
- Castrillo L.A., Roberts D.W., Vandenberg J.D., 2005. The fungal past, present, and future: Germination, ramification and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology*. 89: 46-56.
- Castrillo, L., Griggs, M., Ranger, C.M., Reding, M.E., Vandenberg, J.D., 2011. Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) commercial strains against adult *Xylosandrus germanus* (Coleoptera: Scolytidae) and impact on brood. *Biological Control*. 58(2): 121-126.
- Casuso, V. M., Tarragó, J., Herrera, G., Quintana, F. y Nadal, N., 2011. Manejo de picudo del algodonoero *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae): su relación con el ciclo del cultivo y la influencia de factores ambientales sobre las poblaciones de este insecto. *Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales: Algodón*. 1(2): 142-147.
- Cherry, A. J., Jenkins, N. E., Heviefo, G., Bateman, R. and Lomer, C. J., 1999. Operational and economic analysis of a West African pilotscale production plant for aerial conidia of *Metarhizium* spp. for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*. 9 (1): 35 – 51.

- Cross, W.H., 1973. Biology, control, and eradication of the boll weevil. *Annual Review of Entomology*. 18: 17-45.
- Cross, W.H., Lukefahr, M.J., Fryxell, P.A., Burke, H.R., 1975. Host plants of the boll weevil. *Environmental Entomology*. 4: 19-26.
- Cuadrado, G.A., 2002. *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) en la Zona central y sur oeste de Misiones, Argentina: Polen como fuente alimenticia y su relación con el estado fisiológico en insectos adultos. *Neotropical Entomology*. 31(1): 121 – 132.
- Daoust, R.A., Ward, M.G., Roberts, D.W., 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 41: 151-160.
- Debach, P., 1974. Biological Control by Natural Enemies. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p. 323.
- Dembilio, O., Quesada-Moraga, E., Santiago-Alvarez, C., Jacas, J.A., 2010. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 214–221.
- Devi, K.U., Sridevi, V., Murali Mohan, Ch., Padmavathi, J., 2005. Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Journal of Invertebrate Pathology*. 88: 181-189.
- Dickens, J.C., 1984. Olfaction in the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae): Electroantennogram studies. *Journal of Chemical Ecology*. 10(12): 1759-1785.
- Dickerson, W. A., Haney, P. B., 2001. A review and discussion of regulatory issues. W. A. Dickerson A. L. Brashear J. T. Brumley F. L. Carter W. J. Grefenstette F. A. Harris Boll weevil eradication in the United States through 1999. The Cotton Foundation Publisher Memphis, TN. Pp. 137-156.
- Dimbi, S., Maniania, N.K., Lux, S.A., Mueke, J.M., 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *Biocontrol*. 49: 83-94.
- Dorta, B., Ertola, R.J., Arcas, J., 1996. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 19: 434-439.
- Dubois, T., Lund, J., Bauer, L.S., Hajek, A.E., 2008. Virulence of entomopathogenic hypocrealean fungi infecting *Anoplophora glabripennis*. *Biocontrol*. 53: 517-528.
- Durand, A., 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 113-125.

- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C., 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*. 46: 387– 400.
- Ekesi, S., 2001. Pathogenicity and antifeedant activity of entomopathogenic hyphomycetes to the cowpea leaf beetle, *Ootheca mutabilis* Shalberg. *Insect Science Application*. 21: 55-60.
- Ekesi, S., Maniania N.K., Among-Nyarko, K., 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Science and Technology*, 9(2): 177-185.
- Elena, G.M., Imfeld, E., Pasich, L., Ricciardi, A., Russo, J.L., 2000. Estudio de la cadena nacional agroindustrial algodón de la República Argentina. INTA, EEA Sáenz Peña, Chaco, Argentina. <http://ffyl.uncu.edu.ar/IMG/pdf/ALGODON.pdf>
- Ericsson, J.D., Kabaluk, J.T., Goettel, M.S., Myers, J.H., 2007. Spinosad interacts synergistically with the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* against the exotic wireworms *Agriotes lineatus* and *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Economic Entomology*. 100(1): 31-38.
- Espinel, C., Torres, L., Grijalba, E., Villamizar, L., Cotes, A. M. 2008. Preformulados para control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología*, 34 (1): 351-360.
- Esquivel, J.F., 2007. Evaluation of puncture types as indicators of boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) oviposition in cotton squares. *Environmental Entomology*. 36 (1): 183-186.
- Everett, T.R., Earle, N.W., 1964. Boll weevil oviposition responses in cotton squares and various other substrates. *Journal of Economic Entomology*. 57(5): 651-656.
- Fargues, J., Remaudiere, G., 1977. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia*. 62: 31-37.
- Fargues, J.F., Robert, P.H., 1983. Effects of passing through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*. 29: 576-583.
- Fargues, J., N.K. Maniania, J.C. Dekmas and N. Smiths, 1992. Influence de la température sur la croissance In vitro d'hyphomycetes entomopathogenes. *Agronomie*. 12: 557-564.
- Fargues, J., Delmas, J.C., Lebrun, R.A., 1994. Leaf Consumption by larvae of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) infected with the entomopathogen, *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Entomology*. 87 (1): 67–71.
- Fargues J., Goettel, M.S., Smits, N.Ouedraogo, A.Rougler, M., 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* strains from different origins. *Mycologia*. 89: 389-392.

- Faria, M.R., Wraight, S.P., 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43: 237-256.
- Fatiha, L., Huang, Z., Ren, S., Ali, S., 2008. Effect of *Verticillium lecanii* on biological characteristics and life table of *Serangium japonicum* (Coleoptera: Coccinellidae), a predator of whiteflies under laboratory conditions. *Insect Science*. 15: 327-333.
- Feng, M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G., 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*. 4: 3-34.
- Ferguson, A.W., Williams, I.H., 1991. Deposition and longevity of oviposition-detering pheromone in the cabbage seed weevil. *Physiological Entomology*. 16: 27-33
- Fernandes E.K.K., Rangel, D.E.N., Moraes, A.M.L., Bittencourt, V.R.E.P., Roberts, D.W., 2008. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98: 69-78.
- Fernandes, E.K.K., Angelo, I.C., Rangel, D.E.N., Bahiense, T.C., Moraes, A.M.L., Roberts, D.W., Bittencourt, V.R.E.P., 2011. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 182: 307–318.
- Ferron, P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*. 23: 409-442.
- Ferron, P., Fargues, J. and Riba, G. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. In "Handbook of Applied Mycology" (D. K. Arora, L. Ajello, and K. G. Mujerki, Eds.), Vol. 2, pp. 665–706. Dekker, New York.
- France, A., Gerding, M., Sandoval, A., 2002. Pathogenicity of Chilean isolates of *Beauveria bassiana* to adults of *Asynonychus cervinus* (Coleoptera: Curculionidae). *Agricultura Técnica, INEA*. 62: 489-96.
- Furlong, M.J., Pell J.K., 2005. Interactions between fungal entomopathogens and other beneficial organisms. En: Vega F.E., Blackwell M. (eds.). *Insect-fungal associations ecology and evolution*. pp 51-73.
- Furlong, M. J.; Pell, J. K.; Choo, O. P.; Rahman, S. A., 1995. Field and laboratory evaluation of a sex-pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogen *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) by the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Bulletin of Entomological Research*. 85: 331-337.

- Gabriel, D., 2002. Longevidade do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* Boh., criado em hospedeiras alternativas no laboratório. *Arquivos do Instituto de Biologia*. 69(3): 123 – 126.
- Gindin, G., Levski, S., Glazer, I., Soroker, V., 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica*. 34(4): 370-379.
- Gillespie AT., Claydon N., 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science*. 27:203-215.
- Giometti, F.H.C., Wenzel, I.M.I., Almeida, J.E.M., Leite, L.G., Zappelini, L.O., 2010. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de adultos do bicudo do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *Arquivos do Instituto de Biologia*. 77 (1): 167–169.
- Glare, T.R., Milner, R.J., 1991. Ecology of entomopathogenic fungi, in Handbook of Applied Mycology Humans, Animals and insects (Ajello, D.K. & Mukerji, K.G., Eds.), vol. 2. Marcel Dekker, New York, pp. 613-663.
- Goettel, M.S., Eilenberg J., Glare, T.R., 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S, eds. Elsevier: *Comprehensive Molecular Insect Science*. 6: 361– 406.
- Goodell P.B., 2009. Fifty years of the integrated control concept: the role of landscape ecology in IPM in San Joaquin valley cotton. *Pest Management Science* 65: 1293-1297.
- Greenberg, S.M., Sappington, T.W., Spurgeon, D.W., Sétamou, M., 2003. Boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and reproduction as functions of cotton square availability. *Environmental Entomology*. 32(3): 698-704.
- Greenberg, S.M.; Sétamou M.; Sappington, T.W.; Liu, T.; Coleman, R.J.; Armstrong, J.S.; 2005 a. Temperature-dependent development and reproduction of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Science*. 12: 449-459.
- Greenberg, S.M., Spurgeon, D.W., Sappington, T.W., Sétamou, M., 2005 b. Size dependent feeding and reproduction by boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*. 98 (3): 749–756.
- Greenberg, S.M., Sappington, T.W., Adamczyk, J.J., Liu, T.X., Sétamou, M., 2008. Effects of photoperiod on boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) development, survival, and reproduction. *Environmental Entomology*. 37 (6): 1396 – 1402.
- Hajek, A.E., St. Leger, R.J., 1994. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*. 39, 293–322.

- Haney, P. B., Lewis, W. J., Lambert, W. R., 2009. Cotton production and the boll weevil in Georgia: History, Cost of Control, and Benefits of Eradication. Research Bulletin 428, The University of Georgia. 60 p.
- Hardee, D.D., Cleveland, T.C., Davis, J.W., Cross, W.H., 1970. Attraction of boll weevil to cotton plants and to males fed on 3 diets. *Journal of Economic Entomology*. 63: 990-991.
- Hardee, D.D., Mitchell, E.B., 1997. Boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae): A summary of research on behavior as affected by chemical communication. *Southwestern Entomologist*. 22(4): 466-491.
- Hedgecock, S.; Moore, D.; Higgins, P. M.; Prior, C., 1995. Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium* conidia in an oil formulation. *Biocontrol Science and Technology*, 5: 371-377.
- Herrera G., 2009. Parámetros Climáticos Estación Meteorológica EEA INTA Las Breñas.
- Hirose, E., Neves, P.M.O.J., Zequi, J.A.C., Martins, L.H., Peralta, C.H., Moino Jr., A. 2001. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Brazilian Archives of Biology Technology*. 44(4): 419-423.
- Holder, D.J., Keyhani, N.O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9): 5260-5266.
- Hong, T.D., Jenkins, N.E., Ellis, R.H., 2000. The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycological Research*. 104: 662 – 665.
- Hong, T.D., Ellis, G.J., Jenkins, N.E., Moore, D., 2001. The effect of storage environment on the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*. 105: 81 - 92.
- Horacek, A., Viernstein, H., 2004. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*. 31: 65-71.
- Humber, R.A., 1997a. Fungi: identification. In: Manual of Techniques in Insect Pathology (L. A. Lacey, ed.), Academic, London, United Kingdom. pp. 153-185.
- Humber, R.A., 1997b. Fungi: preservation of cultures. In: Manual of Techniques in Insect Pathology (L. A. Lacey, ed.), Academic, London, United Kingdom. pp. 269-280.
- Humber, R.A., 2000. Fungal pathogens and parasites of insects. In: Applied Microbial Systematics . Priest F, Goodfellow M, eds., pp 199-227.
- Humber, R.A. 2009. Fungi: Entomogenous fungi. In: Encyclopedia of Microbiology, 3rd ed. (M. Schaechter, ed.), pp. 443-456. San Diego: Elsevier.

- ICAC, 2010. 69th Plenary Meeting of the International Cotton advisory Committee. September 20-25, 2010, Texas, EEUU. Informe Argentina sobre situación actual y perspectivas de la producción algodonera.
- ICAC, 2011. 70th Plenary Meeting of the International Cotton advisory Committee. September 4-10, 2011, BsAs, Argentina. Overview of the world cotton market in 2010/2011.
- Ihara, F., Yaginuma, K., Kobayashi, N., Mishiro, K., Sato, T., 2001. Screening of entomopathogenic fungi against the Brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology*. 36(4): 495-500.
- Inglis, D.G., Ivie, T.J., Duke, G.M., Goettel, M.S., 2000. Influence of rain and conidial formulation on persistence of *Beauveria bassiana* on potato leaves and Colorado potato beetle larvae. *Biological Control*. 18: 55-64.
- Inglis, D.G., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H., 2001. Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt TM. Jackson C. Magan N (eds.) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI International, Wallingford, pp 26-69.
- Jackson, M.A., Dunlap, C.A., Jaronski, S.T., 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol*. 55: 129–145.
- Jaronski, S.T., 1997. New paradigms in formulating mycoinsecticides. In: Pesticide formulations and applications systems: 17th volume, G.R. Goss, M.J. Hopkinson, H.M. Collins (eds.). Am. Soc. for Testing and Materials, pp 99-112
- Jaronski, S.T., 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biocontrol*. 55: 159-185.
- Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B.L., Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., Guo, M., Lee, F., Hata, T., 2008. Why for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 112: 583-591.
- Kim K.S., Sappington, T.W., Allen, C.T., 2008. Genetic profiling to determine potential origins of boll weevils (Coleoptera: Curculionidae) captured in a Texas eradication zone: endemism, immigration, or sabotage? *Journal of Economic Entomology*. 101(6): 1729-1736.
- Kosman, E., Cohen, Y., 1996. Procedures for calculating and differentiating synergism and antagonism in action of fungicides mixtures. *The American Phytopathological Society*. 86 (11): 1263-1272
- La Rossa R., Kahn N., 2003. Dos programas de computadora para confeccionar tablas de vida de fertilidad y calcular parámetros biológicos y demográficos en áfidos (Homoptera: Aphidoidea). *RIA INTA*. 32: 127-142.

- Lanteri, A.A., Confalonieri, V., Scattaglini, A., 1997. Estudios moleculares en poblaciones de *Anthonomus grandis*. En Proceedings II Workshop on IPM of the Cotton boll weevil in Argentina, Brazil and Paraguay, Chaco- Argentina. Dec. 1997.
- Lanteri, A.A., Confalonieri, V., Scattaglini, A., 2003. El picudo del algodón en la Argentina: Principales resultados e implicancias de los estudios moleculares. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 62 (3-4): 1-15.
- Lecuona, R.E., Edelstein, J.D., Berretta, M.F., La Rossa, F.R., Arcas, J.A., 2001. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes) strains as a potential agent for control of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*. 38(2): 172-179.
- Lecuona, R.E., 2009. Cría masiva en laboratorio del picudo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera:Curculionidae). In XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Termas de Río Hondo, S. del Estero, Argentina, 30/09, 01 y 02/10/2009.
- Li, D.P., Holdom, D.G., 1994. Effects of pesticides on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*. 63: 209-211.
- Li, J., Feng, M., 2009. Intraespecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycological Research*. 113: 93-99.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M., 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*. 46: 667-702.
- Lord, J.C., 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*. 89: 19-29.
- Machado, A.C.R., Monteiro, A.C., Belasco de Almeida, A.M., Espagnoli Geraldo Martins, M. I., 2010. Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 45 (10): 1157-1163.
- Maia, A.H.N., Luiz, A.J.B., Campanhola, C., 2000. Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife technique: Computational aspects. *Journal of Economic Entomology*. 93(2): 511-518.
- Martins, W.F.S., Ayres, C.F.J., Lucena, W.A., 2006. Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), the major cotton pest in the New World. *Genetics and Molecular Research*. 6(1): 23-32.
- McCannon, S. A., Rath, A. C., 1994. Separation of *Metarhizium anisopliae* strains by temperature dependent germination rates. *Mycological Research*. 98: 1253 - 1257.

- McLaughlin, R.E., 1962. Infectivity test with *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on *Anthonomus grandis* Boheman. *Journal of Insect Pathology*. 4: 386–388.
- Meyling, N.V., Eilenberg, J., 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*. 43: 145-155.
- Milner, R.J., Huppertz R.J., and Swaris S.C., 1991. A new method for assessment of germination of *Metarhizium conidia*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 57: 121-123.
- Milner, R.J., Samson, P.R., Bullard, G.K., 2002. FI-1045: A profile of commercially useful isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*. 12: 43-58.
- Miranda, J.E., Da Silva, C.A.D., 2005. Behavioural control of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), in Northeast Brazil. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*. 31: 509 - 515.
- Monnerat, R., Dias, S. C., Oliveira-Neto, O. B. de, Nobre, S. D., Sá, M. F. G. de., 1999. Criação do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em dieta artificial e estabelecimento de metodologia para bioensaios com *Bacillus thuringiensis*. In: Congresso Brasileiro de Algodão, 2. Riberão Preto, 5-10/9/99. Anais. pp. 214.
- Monnerat, R.G., Nobre, S.D.N., Neto, O.B.O., Schmidt, F.G.V., Dias, S., Lauman, R., Sá, M.F.G., Sujii, E.R., 2002. Parâmetros bionômicos do Bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) criado em dieta artificial para realização de bioensayos. *Boletim de Pesquisa e desenvolvimento*. 1(29): 1-20.
- Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G., King, E.G., 1995a. Venom of *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) and its role in parasitoid development and host regulation. *Annals of the Entomological Society of America*. 88: 800-808.
- Morales-Ramos, J.A., Summy, K.R., King, E.G., 1995b. Estimating parasitism by *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) after inundative releases against the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*. 24: 1718-1725.
- Murad, A.M., Laumann, R.A., Lima, T.A., Sarmiento, R.B.C., Noronha, E.F., Rocha, T.L., Valadares-Inglis, M.C., Franco, O.L., 2006. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 142: 365–370.
- Neves, P.M.O.J., Hirose, E., Tchujo, P.T., Moino Jr., A., 2001. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology*. 30: 263-268.

- Oliveira, C.D., Siqueira, J.P., Nakamura, P.H e Silva J.C., 1994. Pathogenicity of morphological mutants and wild-types of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Var. majus and minus against *Anthonomus grandis* Boheman. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 23(3): 425 – 430.
- Oliveira, C.N., Neves, M.O., Kawazoe, L.S., 2003. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola*. 60 (4): 663–667.
- Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M.S., Lomer, C.J., 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*. 137: 37-43.
- Ouedraogo, R.M., Cusson, M., Goettel, M.S., Brodeur, J., 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 82: 10-109.
- Ouedraogo, R.M., Goettel, M.S., Brodeur, J., 2004. Behavioral thermoregulation in the migratory locust: a therapy to overcome fungal infection. *Oecologia*. 138: 312-319.
- Parrott, W.L., Jenkins, J.N., Buford, W.T., 1970. Instars and duration of stadia of boll weevil larvae. *Annals of the Entomological Society of America*. 63: 1265-1267.
- Peng G., Xia Y. 2011. The mechanism of the mycoinsecticide diluents on the efficacy of the oil formulation of insecticidal fungus. *Biocontrol*. 53: 893 – 902.
- Posadas, J. B., Comerio, R. M. Mini, J. I., Nussenbaum, A. L., Lecuona, R. 2012. A novel dodine-free selective medium based on the use of Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) to isolate *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* from soil. *Mycologia*. 104 (4): 974-980.
- Posadas, J.B., Angulo Lewylle, M., Mini J.I., Lecuona, R.E. 2013. Natural tolerance to UV-B and assessment of photoprotectants in conidia of six native isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuillemin. *World Applied Sciences Journal*. 20(7): 1024-1030.
- Posada-Flórez F.J., 2008. Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. *Journal of Insect Science*. 8 (41): 1 - 13.
- Purwar JP, Sachan GC., 2006. Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillar *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae). *Microbiological Research*. 161: 38-42.
- Quintela, E.D., Roberts, D.W., 1992. Controle de *Chalcodermus bimaculatus* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) no solo com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 27: 95-105.

- Quintela, E.D., McCoy, C.W., 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instar of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environmental Entomology*. 26(5): 1173-1182.
- Rabinovich, J.E., 1980. Introducción a la ecología de poblaciones animales. Editorial CECSA. Caracas (Venezuela), pp. 313.
- Rachappa, V., Lingappa, S., Patil, R.K., 2007. Effect of Agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. *Karnataka Journal of Agricultural Science*. 20 (2): 410-413
- Ramvalho, F. S., Medeiros, R.S., Lemos, W.P., Wanderley, P.A., Dias, J.M., Zanuncio, J.C., 2000. Evaluation of *Catolaccus grandis* (Burks) (Hym., Pteromalidae) as a biological control agent against cotton boll weevil. *Journal of Applied Entomology*. 124: 359-364.
- Ramvalho, F.S., Silva, A.M.C., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2007. Competition between *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) and *Bracon vulgaris* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of the boll weevil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50(3): 371-378.
- Ramaraje Urs, N.V., Govindu, H.C., Shivashankara Shastry, K.S., 1967. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 9: 398 - 403.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.I., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*. 88: 116 -125.
- Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D., Larinde, M., 2006. Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for Genebanks. N°8. Bioversity International, Rome, Italy. 163 p.
- Reddy, G. V. P., Furlong, M. J., Pell, J. K., Poppy G. M., 1998. *Zoophthora radicans* infection inhibits the response to and production of sex pheromone in the diamondback moth. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72: 167-169.
- Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G., Luangsa-ard, J.J., Devotto, L., Humber, R.A., 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*. 103 (5): 1055–1073.
- Roberts, D.W., 1980. Entomopathogenic fungi. Allenheld, Osmun & Co., Montclair, New Jersey.
- Roberts D.W., Humber, R.A., 1981. Entomogenous fungi. In: Biology of conidial fungi. Vol. 2. Garry T. Cole and Bryce Kenarick (eds.). Academic Press. New York. Pp. 201-236.

- Roberts D.W., Hajek A.E., 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. In: Leatham GF, ed. *Frontiers in industrial mycology*. New York: Chapman & Hall. Pp. 144–159.
- Robertson, J.L., Preisler, H.K., Rusell, R.M., 2003. *Poloplus: probit and logit analysis user's guide*. LeOra software, Boca Raton, Florida, USA.
- Roy, H.E., Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E., Pell, J.K., 2006. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology*. 51: 331-357.
- SAGPyA 2013. Estadísticas de cultivos. <http://www.minagri.gov.ar>
- Samuels, K.D.Z., Heale, J.B., Llewellyn, M., 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53: 25-31.
- Santos, R.C., Marcellino, L.H., Monnerat, R.G., Gander, E.S., 2003. Mechanical damage in cotton buds caused by the boll weevil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38(11): 1351-1356.
- Sappington, T.W., Spurgeon, D.W., 2000. Preferred technique for adult sex determination of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 93: 610-615.
- Scataglini, M.A., Confalonieri, V.A., Lanteri, A.A., 2000. Dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: evidence of RAPD analysis. *Genetica*. 108: 127-136.
- Scataglini, M.A., Lanteri, A.A., Confalonieri, V.A., 2006. Diversity of boll weevil populations in South America: a phylogeographic approach. *Genetica*. 126: 353-368.
- Scholte, E.-J., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans K., Abdulla S., Killen, GF., Knols, B.G., 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*. 308: 1641-1642.
- Shah, P.A., Pell J.K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 413-423.
- Showler, A.T., 2004. Influence of cotton fruit stages as food sources on boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and oviposition in field conditions. *Journal of Economic Entomology*. 98: 1572-1579.
- Showler, A.T., 2005. Relationships of different cotton square sizes to boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and oviposition in field conditions. *Journal of Economic Entomology*. 98: 1572 – 1579.
- Silva, C.A.D., 2001. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogénicos ao bicudo-do-algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 36 (2): 243–247.
- Southwood, T.R. 1995. *Ecological methods*. 2nd. Ed., London, Chapman & Hall, 524 pp.

- Spurgeon, D.W., Raulston, J.R., 1998. Boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) reproductive development as a function of temperature. *Environmental Entomology*. 27(3): 675 - 681.
- Stadler, T., 2009. Método de diagnóstico para el monitoreo de Resistencia a insecticidas en poblaciones de “picudo del algodón”, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 68 (1-2): 231-239.
- Stadler, T., Buteler, M., 2007. Migration and dispersal of *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) in South America. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 66 (3-4): 205-217.
- Steinkraus, D.C., 2006. Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. *Journal of Invertebrate Pathology*. 92: 125-131.
- Stern, V.M., Smith, R.F., van den Bosch, R., Hagan, K.S., 1959. Integrated control concept. *Hilgardia*. 29 (2): 81-101.
- Tafoya, F., Zuñiga – Delgadillo, M., Alatorre, R., Cibrian – Tovar, J., Stanley, D., 2004. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the cactus weevil *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. *Florida Entomologist*. 87 (4): 533 - 536.
- Tamai, M.A., Alves, S.B., Lopes, R.B., Faion, M., Padulla, L.F.L., 2002. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico*. 69 (3): 89-96.
- Tefera, T., Pringle, K.L., 2003. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 84: 220-225.
- Toapanta, M.A., Schuster, D.J., Stansly, P.A., 2005. Development and life history of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Environmental Entomology*. 34(5): 999-1008.
- Torrado-León, E., Montoya Lerma, J. Valencia Pizo, E., 2006. Sublethal effects of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) under laboratory conditions. *Mycopathologia*. 162: 411-419.
- Tumlinson, J. H., Hardee, D. D., Gueldner, R. C., Thompson, A. C., Hedin, P. A., Minyard, J. P., 1969. Sex pheromones produced by male boll weevils: isolation, identification, and synthesis. *Science*. 166: 1010-1012.

- Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoli, M., Infante, F., Rehner, S.A., 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*. 46: 72–82.
- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzon, A., Ownley, B.H., Pell, J.K., Rangel, D.E.N., Roy, H.E., 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*. 2: 149-159.
- Vey, A., Gotz, P., 1986. Antifungal cellular defense mechanisms in insects. In Gupta, A. P. Ed. Hemocytic and humoral immunity in arthropods. New York, John Wiley, pp 89-115.
- Vidal, C., Fargues, J., Lacey, L.A., 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology*. 70: 18-26.
- Walstad, J.D., Anderson, R.F., Stambaugh, W.J., 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 16: 221 - 226.
- Wraight, S.P., Inglis, G.D., Goettel, M.S., 2007. Fungi. In: Field manual of techniques in invertebrate: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. L.A. Lacey, H.K. Kaya (Eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 223 – 248.
- Wright, J.E., 1993. Control of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) with Naturalis-L: a mycoinsecticide. *Journal of Economic Entomology*. 86 (5): 1355–1358.
- Wright, J.E., Chandler, L.D., 1991. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against the boll weevil (Curculionidae: Coleoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*. 58: 448–449.
- Wright, J.E., Chandler, L.D., 1992. Development of a biorational mycoinsecticide: *Beauveria bassiana* conidial formulation and its application against boll weevil populations (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*. 85 (4): 1130–1135.
- Ying, S.H., Feng, M.G., 2004. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 323-331.
- Yip, H.Y., Rath, A.C., Koen, T.B., 1992. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabidae: *Adoryphorus couloni*). *Mycological Research*. 96(2), 92-96.
- Zacharuk, R.Y., 1973. Electron-microscope studies of the histopathology of fungal infections by *Metarhizium anisopliae*. *Miscellaneous Publication of the Entomological Society of America*. 9: 112-119.

Zhao, G., Liu, W., Brown, J.M., Knoeles, C.O., 1995. Insecticide resistance in field and laboratory strains of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*. 88: 1164–1170.

Anexos

Anexo 1: Porcentaje promedio de mortalidad (\bar{M}) y tiempo de supervivencia medio (TS_{50}) (Intervalos de confianza del 95/Andersen (IC_{95})) de adultos de *A. grandis* inoculados por inmersión en una suspensión con 5×10^8 conidia/ml de los aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* obtenidos de la Colección de Hongos Entomopatógenos (Lab. Hongos Entomopatógenos, IMYZA, INTA Castelar).

Aislamiento	\bar{M} (Mín-Máx)	TS_{50} (IC_{95})	Origen del aislamiento	Localidad	Fecha aislamiento
<i>Beauveria bassiana</i>					
Bb 2	59 (40-70)	n.c.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Pergamino/ Buenos Aires	1990
Bb 5	26 (10-40)	n.o.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Lincoln/ Buenos Aires	1990
Bb 7	18 (0-40)	n.o.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	9 de Julio/ Buenos Aires	1990
Bb 8	26 (10-50)	n.o.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	25 de Mayo/ Buenos Aires	1990
Bb 9	62 (10-90)	n.c.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Venado Tuerto/ Santa Fe	1990
Bb 10	6 (0-10)	n.o.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Elortondo/ SantaFe	1990
Bb 12	67 (50-87,5=)	n.c.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Huinca Renancó/ Córdoba	1990

Bb 13	44 (30-60)	n.o.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Huinca Renancó/ Córdoba	1990
Bb 17	42 (22-50)	n.o.	<i>Spilosoma virginica</i> (Lep: Lymantriidae)	Pergamino/ Buenos Aires	1990
Bb 23	90 (80-100)	7,00 (6,41- 7,59)	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Pergamino/ Buenos Aires	1990
Bb 24	50 (30-70)	n.o.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Colón/ Buenos Aires	1990
Bb 26	12 (0-20)	n.o.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Colón/ Buenos Aires	1990
Bb 36	66 (50-80)	n.c.	<i>Tibraca limbativentris</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Goiânia/ GO/ Brasil	1982
Bb 37	0 (0)	n.o.	<i>Nezara viridula</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Yerba Buena/ Tucumán	1986
Bb 38	26 (10-50)	n.o.	<i>Nezara viridula</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Chapecó/ SC/ Brasil	1984
Bb 40	44 (20-70)	n.o.	<i>Euselasia sp</i> (Lepidoptera: Erycinidae)	Rio Grande do Sul/ Brasil	1988
Bb 41	58 (50-70)	n.c.	Homoptera: Cercopidae	Piracicaba/ SP/ Brasil	1989
Bb 45	52 (30-70)	n.c.	<i>Diabrotica sp.</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	Brasília/ DF/ Brasil	1988

Bb 47	76 (60-90)	n.c.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Ipojuca/ PE/ Brasil	1983
Bb 65	64 (40-80)	n.c.	<i>Nezara viridula</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Oliveros/ Santa Fe	1992
Bb 68	39 (17-60)	n.o.	Coleoptera: Scarabaeidae	Pergamino/ Buenos Aires	1993
Bb 70	32 (10-60)	n.o.	Coleoptera: Scarabaeidae	Pergamino/ Buenos Aires	1993
Bb 71	34 (10-60)	n.o.	Suelo	Oliveros/ Santa Fe	1994
Bb 73	0 (0)	n.o.	Suelo	Oliveros/ Santa Fe	1994
Bb 75	82 (70-90)	n.c.	Suelo	Oliveros/ Santa Fe	1994
Bb 79	58 (40-80)	n.c.	Suelo	Pergamino/ Buenos Aires	1993
Bb 80	16 (0-40)	n.o.	Suelo	Pergamino/ Buenos Aires	1993
Bb 81	47 (33-60)	n.o.	<i>Phyrdenus muriceus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Córdoba	1993
Bb 98	62 (50-90)	n.c.	<i>Cyclocephala signaticollis</i> (Coleoptera: Scarabaeidae)	Balcarce/ Buenos Aires	1996
Bb 112	84 (70-100)	n.c.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Orthoptera: Acrididae)	Rafaela/ Santa Fe	1999
Bb 132	20 (10-40)	n.o.	<i>Deuterocampta quadrijuga</i> (Coleoptera: Crisomelidae)	Córdoba	1999
Bb 175	25 (20-33)	n.o.	<i>Rh. (Bo) microplus</i> (Acari: Ixodidae)	Castelar/ Buenos Aires	2004

Bb 241	58 (40-70)	n.c.	<i>Acromyrmex lundi</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 243	0 (0)	n.o.	<i>Acromyrmex lundi</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 244	52 (30-90)	n.c.	<i>Acromyrmex lundi</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 246	22 (10-40)	n.o.	<i>Acromyrmex lundi</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 247	48 (30-70)	n.o.	<i>Acromyrmex lundi</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 250	18 (10-20)	n.o.	<i>Acromyrmex lundi</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 251	34 (20-50)	n.o.	<i>Acromyrmex lundi</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 257	26 (20-30)	n.o.	Suelo	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 258	6 (0-10)	n.o.	Suelo	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 259	18 (10-40)	n.o.	Suelo	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 260	20 (10-30)	n.o.	Suelo	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 262	18 (10-30)	n.o.	Suelo	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 264	8 (0-20)	n.o.	Suelo	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 265	24 (20-30)	n.o.	Suelo	Castelar/ Buenos Aires	2006

Bb 268	22 (0-50)	n.o.	Suelo	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 270	36 (10-80)	n.o.	Suelo	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 272	22 (10-50)	n.o.	Suelo	Castelar/ Buenos Aires	2006
Bb 275	24 (10-50)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Ortoptoptera: Acrididae)	Metileo/ La Pampa	2008
Bb 277	28 (0-50)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Ortoptoptera: Acrididae)	Metileo/ La Pampa	2008
Bb 279	30 (20-40)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Ortoptoptera: Acrididae)	Luan Toro/ La Pampa	2008
Bb 280	26 (10-40)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Ortoptoptera: Acrididae)	Luan Toro/ La Pampa	2008
Bb 285	24 (20-30)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Ortoptoptera: Acrididae)	Anguil/ La Pampa	2008
Bb 286	90 (70-100)	8,00 (7,50 - 8,50)	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Ortoptoptera: Acrididae)	Anguil/ La Pampa	2008
Bb 288	30 (10-50)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Ortoptoptera: Acrididae)	Luan Toro/ La Pampa	2008
Bb 290	16 (10-20)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Ortoptoptera: Acrididae)	General Pico/ La Pampa	2008
Bb 291	20 (10-40)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Ortoptoptera: Acrididae)	Anguil/ La Pampa	2008

Bb 292	20 (10-30)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Orthoptera: Acrididae)	General Pico/ La Pampa	2008
Bb 294	22 (10-40)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Orthoptera: Acrididae)	General Pico/ La Pampa	2008
Bb 295	26 (10-40)	n.o.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Orthoptera: Acrididae)	General Pico/ La Pampa	2008
Bb 296	70 (60-80)	n.c.	<i>Rhammatocerus pictus</i> (Orthoptera: Acrididae)	Anguil/ La Pampa	2008
Bb 301	92 (80-100)	9,00 (8,17 - 9,83)	<i>D. hydrophilides</i> (Coleoptera: Scarabaeide)	Reconquista/ Santa Fe	2009
Bb 302	90 (80-100)	7,00 (6,54 - 7,46)	Suelo	Reconquista/ Santa Fe	2009
Bb 303	72 (50-90)	n.c.	Suelo	Reconquista/ Santa Fe	2009
Bb 316	22 (10)	n.o.	<i>A. grandis</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Las Breñas/ Chaco	2010

Metarhizium anisopliae

Ma 1	82 (60-100)	n.c.	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2005
Ma 2	100 (100)	5,00 (4,87 - 5,13)	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2005
Ma 4	54 (30-70)	n.c.	Suelo	Oliveros/ Santa Fe	1995
Ma 5	92 (70-100)	5,00 (4,74 - 5,26)	Suelo	Rafaela/ Santa Fe	1996

Ma 6	92 (80-100)	6,00 (5,64 - 6,36)	<i>Diloboderus abderus</i> (Coleoptera: Scarabeidae)	Pergamino/ Buenos Aires	1993
Ma 7	100 (100)	6,00 (5,75 - 6,25)	<i>Diloboderus abderus</i> (Coleoptera: Scarabeidae)	Pergamino/ Buenos Aires	1993
Ma 8	42 (20-80)	n.o.	Suelo	Oliveros/ Santa Fe	1995
Ma 10	32 (20-60)	n.o.	Suelo	Oliveros/ Santa Fe	1995
Ma 13	40 (10-60)	n.o.	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2005
Ma 14	98 (90-100)	6,00 (5,66 - 6,34)	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2005
Ma 15	66 (40-100)	n.c.	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2005
Ma 16	92 (80-100)	5,00 (4,84 - 5,16)	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2005
Ma 17	92 (80-100)	5,00 (4,79 - 5,20)	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2005
Ma 18	86 (80-90)	n.c.	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2005
Ma 20	100 (100)	6,00 (5,74 - 6,26)	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Castelar/ Buenos Aires	2005
Ma 21	44 (30-60)	n.o.	<i>Acromyrmex lundii</i>	Castelar/ Buenos Aires	2005

			(Hymenoptera: Formicidae)		
Ma 25	80 (60-100)	n.c.	<i>Acromyrmex lundii</i>	Castelar/ Buenos Aires	2005
			(Hymenoptera: Formicidae)		
Ma 27	72 (60-90)	n.c.	<i>Acromyrmex lundii</i>	Castelar/ Buenos Aires	2005
			(Hymenoptera: Formicidae)		
Ma 31	90 (80-100)	6,00 (5,54 - 6,46)	Suelo	Oliveros/ Santa Fe	1996
Ma 32	40 (0-60)	n.o.	Coleoptera: Scarabaeidae	Adelaide/ Australia	1990
Ma 35	98 (90-100)	5,00 (4,74 - 5,26)	<i>Diloboderus abderus</i>	Pergamino/ Buenos Aires	1993
			(Coleoptera: Scarabeidae)		
Ma 36	94 (90-100)	6,00 (5,48 - 6,52)	Suelo	Oliveros/ Santa Fe	1995
Ma 41	96 (90-100)	6,00 (5,84 - 6,16)	Coleoptera: Scarabeidae	Brasilia/ Brasil	1988
Ma 45	90 (80-100)	6,00 (5,24 - 6,76)	Suelo	Huerta Grande/ Córdoba	2009
Ma 46	88 (70-100)	n.c.	Suelo	Huerta Grande/ Córdoba	2009
Ma 47	66 (50-80)	n.c.	Suelo	Las Toscas/ Santa Fe	2009
Ma 49	98 (90-100)	6,00 (5,70 - 6,30)	Suelo	Las Toscas/ Santa Fe	2009
Ma 50	100 (100)	4,00 (3,57 - 4,43)	Suelo	Las Toscas/ Santa Fe	2009

n.o. = no fue calculado debido a que las mortalidades fueron inferiores al 50/ . n.c. = no fue calculado.

Anexo 2: Formulados aprobados por el SENASA para uso en picudo del algodón (2009)

Empresa	N°inscripción	Marca comercial	Principio activo
Plato de argentina s.a.	33422	Dipi dispensador de insec.	d.d.v.p.
Chemotecnica s.a.	32876	Atrion	beta-cipermetrina
Nidera s.a.	35060	Bulldock zamba	beta-ciflutrina
Nidera s.a.	35062	Beta baytroid zamba	beta-ciflutrina
Bayer s.a.	31820	Bulldock	beta-ciflutrina
Bayer s.a.	32452	Beta baytroid 5 ec	beta-ciflutrina
Bayer s.a.	30357	Baytroid 5	ciflutrina
Bayer s.a.	32618	Bitan flow 5 sc	deltametrina
Borches y cia s.a.	34588	Deltamax	deltametrina
Compañía ascariscer s.a.	34211	Extra tackle	deltametrina
Lanther quimica s.a.	34587	Delta 10	deltametrina
Alfalfares s.r.l.	35108	Alfasan 35	endosulfán
Atanor s.c.a.	34344	Endosulfan atanor 35	endosulfán
Bayer s.a.	30855	Thiodan 35 ec	endosulfán
Brometan s.r.l.	34696	Endosulfan brometan	endosulfán
Dupont argentina s.a.	33393	Endosulfan agar cross	endosulfán
Enrique m.baya casal s.a.	35287	Endosulfan 35 arn ebc	endosulfán
Felix menendez s.r.l.	33943	Fcm endosulfan	endosulfán
Gleba s.a.	34370	Endosulfan 35 glex	endosulfán
Laboratorios degser s.r.l.	34751	Endodegser	endosulfán
Lanther quimica s.a.	34125	Endosulfan lq 35	endosulfán
Magan argentina s.a.	31054	Thionex-l	endosulfán
Magan argentina s.a.	35086	Thionex	endosulfán
Nova s.a.	35319	Endosulfan nova	endosulfán
Nufarm s.a.	35139	Endosulfan nufarm	endosulfán
Philagro s.a.	35231	Philendo	endosulfán
Philagro s.a.	35353	Endosulfan aeg	endosulfán
Reopen s.a.	34180	Daargussulfan	endosulfán
Terrium argentina s.a.	33374	Endosulfan terrium	endosulfán
Magan argentina s.a.	33317	Suprathion 20 wp	metidación
Fmc latinoamerica s.a.	32672	Furia	zetametrina
Fmc latinoamerica s.a.	33745	Furia 40'ec	zetametrina
Fmc latinoamerica s.a.	35047	Fury 20 ew	zetametrina
Fmc latinoamerica s.a.	35162	Mustang 20 ew	zetametrina
Aranami s.a.	33910	Araciper 25	cipermetrina

Ciagro s.a.	34120	Kalibre 25	cipermetrina
Ciagro s.a.	35556	Microactive 25 me	cipermetrina
Ciagro s.r.l.	31796	Kalibre 25	cipermetrina
Ciagro santa fe s.r.l.	35413	Librek	cipermetrina
Crespo s.r.l.	33804	Cipermetrina controler	cipermetrina
Dow agrosiences arg.s.a.	30743	Nurelle 25e	cipermetrina
Dupont argentina s.a.	30784	Cipermetrina dupont	cipermetrina
El floricultor	31243	Cipermetrina el floricultor	cipermetrina
Fav s.r.l.	34360	Ciperfav 25	cipermetrina
Fitoquim s.a.	30233	Cipermetrina fq	cipermetrina
Fmc latinoamerica s.a.	31089	Arrivo	cipermetrina
Fmc latinoamerica s.a.	32635	Commanche	cipermetrina
Formulagro s.r.l.	32715	Cipermetrina 25 formulagro	cipermetrina
Gleba s.a.	32373	Glextrin 25	cipermetrina
Gleba s.a.	33375	Zipertrin	cipermetrina
Lanther quimica s.a.	33843	Cipermetrina lq 25	cipermetrina
Marketing agricola s.r.l.	34811	Cipermetrina mark agricola	cipermetrina
Nufarm s.a.	35137	Cipermetrina nufarm	cipermetrina
Sharda worldwide exports pvt	35550	Cipermetrina sharda 25	cipermetrina
Siner s.a.	35337	Cipermetrina siner	cipermetrina