



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Evaluación de herramientas de manejo integrado de plagas para hormigas cortadoras de hojas en el Bajo Delta del Río Paraná

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

Lic. Daiana Vanesa Perri

Director de tesis: Dr. Schilman Pablo
Dra. Gorosito Norma

Consejero de Estudios: Dr. Schilman Pablo

Lugar de trabajo: Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA)

Buenos Aires 2020

RESUMEN

EVALUACIÓN DE HERRAMIENTAS DE MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS PARA HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS EN EL BAJO DELTA DEL RÍO PARANÁ

Resumen. Las hormigas cortadoras de hojas son consideradas ingenieras del ecosistema, pero en los monocultivos forestales se transforman en plaga debido a la homogeneización del paisaje. Su manejo es casi exclusivamente mediante la aplicación de cebos cuyos compuestos han sido prohibidos en muchos países por su toxicidad. La estrategia *push-pull*, enmarcada dentro del manejo integrado de plagas, implica la utilización de estímulos repelentes y atrayentes en simultáneo, en un diseño que direcciona el movimiento y la distribución de la plaga fuera del cultivo. El trabajo presentado en esta tesis tuvo como objetivo identificar, evaluar y seleccionar herramientas para ser utilizadas en el manejo de las especies del género *Acromyrmex* en plantaciones de salicáceas en el Bajo Delta del Río Paraná. Como estímulo *push* (repelente) se estudió con éxito la utilización de farnesol (un sesquiterpeno obtenido industrialmente del aceite de semillas de cucurbitáceas) como repelente de corto alcance; y como estímulo *pull* (atrayente) la vegetación de crecimiento espontáneo de la zona, y el refuerzo con aceite esencial de naranja, ambos de largo alcance. La estrategia fue evaluada en varias escalas, la mayor fue a campo, en parcelas de plantaciones jóvenes de sauces, con muy buenos resultados para ser utilizada en la práctica.

Palabras clave: Push-pull; Hormigas cortadoras de hojas; Plantaciones forestales; Bajo Delta del Río Paraná; Humedales.

ABSTRACT

EVALUATION OF INTEGRATED PEST MANAGEMENT TOOLS FOR LEAF-CUTTING ANTS IN THE LOWER DELTA OF THE PARANÁ RIVER

Abstract. Leaf-cutting ants are considered ecosystem engineers, but in forest monocultures they become a pest due to the homogenization of the landscape. Their management is almost exclusively through the application of baits, which were forbidden in many countries owed to their toxicity compound. The push-pull strategy, framed within the integrated pest management, implies the use of repellent and attractive stimuli simultaneously, in a design that directs the movement and distribution of the pest away from the crop. The objective of the work presented in this thesis was to identify, evaluate and select tools to be used in the management of *Acromyrmex* species in salicaceae plantations in the Lower Delta of the Paraná River. As push stimulus (repellent), the use of farnesol (a sesquiterpene industrially obtained from the oil of cucurbitaceae seeds) as a short-range repellent was successfully studied. As pull stimulus (attractant), the spontaneously growing vegetation of the area, and the reinforcement with orange essential oil, were positive evaluated as long-range stimuli. The strategy was tested on several scales, the largest was in field, in plots of young willow plantations, with very good results to be used in practice.

Keywords: Push-pull; Leaf-cutting ants; Forestry plantations; Lower Delta of the Paraná River; Wetlands.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras (Norma Gorosito y Patricia Fernández) y director (Pablo Schilman), por enseñarme todo lo que aprendí en esta etapa de formación profesional, por siempre confiar en mi capacidad, y también darme las libertades para que pudiera desarrollarme independientemente. A Norma por explicarme todo lo que sé sobre hormigas, por revelarme este mundo de los insectos sociales, que a veces me sigue sonando tan de ciencia ficción. A Pato por siempre incentivarme a hacer un experimento más, otro día de medición, otra salida a campo, esto me ayudó muchísimo a aprender que a veces los resultados llevan tiempo y que no hay que frustrarse. A Pablo por enseñarme a cuestionar las metodologías, los resultados, a seguir probando hasta encontrar el error y corregirlo, a trabajar con paciencia con mis rebeldes objetos de estudio. Sobre todo, gracias a los tres por haberme acompañado no solo académicamente, sino personalmente durante todos estos años, en mis mejores y peores momentos. Por esas charlas de horas, donde teníamos que renovar el mate varias veces, salidas de campo donde me utilizaban como atrayente de mosquitos, y siempre, siempre compartiendo algo rico para comer.

A mis compañeros de la materia Agroecosistemas Campesines por mostrarme otra forma de trabajo, por sacarme del laboratorio y llevarme a embarrar de realidad. Por ayudarme a construir la idea del tipo de ciencia que quiero hacer. Con ustedes aprendí que si hay un equipo con mucha voluntad y pasión por hacer (y dos ventiladores), no necesitamos un subsidio de miles para hacer Investigación Acción Participativa. Gracias por convencerme de que otro mundo es posible y que cada acción cuenta.

A Micaela Buteler por compartir conmigo su experiencia de trabajo tanto en campo, como en laboratorio. Por contagiarme su entusiasmo con cada resultado que obteníamos de los ensayos.

A todos los trabajadores de la Estación Experimental INTA Delta por haberme recibido siempre como una más. A Laura Gurini por haberme enseñado a identificar todas las plantas de la zona; a Natalia Fracassi por compartirme su amor por la fauna del Delta; a Teresa Cerrillo por brindarme su conocimiento sobre las plantaciones, la vida como isleña, y por las enriquecedoras discusiones; a Silvia Cortizo por haberme llevado y traído innumerables veces de la isla; a Hugo Rossi y Marcelo Martínez por ayudarme en las tareas de campo, compartir conmigo su conocimiento del lugar y estar siempre atentos por si encontraban un hormiguero nuevo. Y muy, muy especialmente a Edgardo Casaubón y Guillermo Madoz, por esperarme siempre con mates e historias cuando sabían que iba, brindarme un espacio en su oficina para que pudiera utilizar, haberse dejado convencer de que las hormigas “son buenas”, e incluso tomar la tarea de convencer a otros también. A Edgar por dejarme utilizar su espacio en la experimental para poder hacer mis ensayos, por las infinitas charlas llenas de anécdotas, por

contagiarme su pasión por el trabajo. A Guille por haber sido mi compañero número uno en el campo, ayudándome a plantar, regar, cortar, buscar hormigueros, e incluso ofrecerme su propio campo para poder hacer mis ensayos.

A mi *dream team* estadístico, Camila Dávila y Juan Fiorenza, que me ayudaron a pensar los análisis que mejor se ajustaran a los datos, a aprender a escribirle al señor R para que me entendiera. Gracias por las reuniones ñoñas donde escuchaban los diseños experimentales para discutir resultados; por estar disponibles cualquier día, a cualquier hora, para hablar de estadística. No hubiera nunca podido terminar esta tesis si no hubiera sido por su gran ayuda.

A mis compañeros y amigos de Biomoléculas, por haberme reemplazado en clases cuando tenía cursos, y haber cuidado de las hormigas cuando salía a algún viaje. Se que todes dentro de la catedra aprendieron a convivir (a pesar de las fugas) y hasta quererlas.

A mis compañeros de Laboratorio, Carmen Rolandi y Nacho Muñoz, por haber cuidado y alimentado a las colonias cuando yo no podía.

A quienes me ayudaron en el campo: Marcelo Lois, Ayelén Nally, Camila Dávila, Lucia Barriga, Juan Fiorenza. Gracias por haberme acompañado en esos días, sé que el clima y los varios hematófagos del Delta hacían de la simple ayuda de tomar datos, una tarea un poco más complicada.

A Nadia Jiménez con quien compartí muchas de mis estadías en el Delta, ambas trabajando en experimentos a campo para nuestras tesis con hormigas cortadoras. Este camino fue mucho más fácil con su compañía.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET), por haberme otorgado la beca que me permitió realizar esta tesis.

A Alexandra Elbakyan, gracias a su idea de acceso libre a la ciencia, llevada a la práctica con su proyecto Sci-Hub, me permitió disponer de toda la bibliografía necesaria para mi formación.

A mi familia, y a mi amiga Micaela, por siempre haberme alentado a seguir estudiando, y luchando para poder trabajar de lo que amo, y entender que para mí no es solo una profesión, sino una vocación.

Por último, a mi compañera más leal, mi perra Gaia, que estuvo sentada a mi lado durante toda la escritura de esta tesis, que resistió mis ausencias cuando iba a algún Congreso, y que me brinda su amor incondicional cada día.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
AGRADECIMIENTOS	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
CAPÍTULO 1: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	11
1.1.RECOLECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE COLONIAS DE <i>ACROMYRMEX AMBIGUUS</i>	11
1.2.ESTABLECIMIENTO DE SUBCOLONIAS	12
CAPÍTULO 2: ESTÍMULO PUSH - REPELENTE	13
2.1. INTRODUCCIÓN	13
2.2. METODOLOGÍA	15
2.2.1.Evaluación de repelencia del Farnesol	15
2.2.2.Rango de acción del farnesol	16
2.2.3.Duración del efecto repelente	17
2.3. RESULTADOS	18
2.3.1.Evaluación de repelencia del Farnesol	18
2.3.2.Rango de acción del farnesol	19
2.3.3.Duración del efecto repelente	19
2.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	20
CAPÍTULO 3: ESTÍMULO PULL – VEGETACIÓN COMO ATRAYENTE	22
3.1. INTRODUCCIÓN	22
3.2. METODOLOGÍA	24
3.2.1.Disponibilidad de vegetación y selección por las hormigas	24
3.2.2.Ensayos de preferencia de cafetería y duales	25
3.2.2.1. Ensayos de cafetería.....	25
3.2.2.2. Ensayos duales.....	25
3.2.3.Ensayo a campo de plantaciones con y sin vegetación	27
3.3. RESULTADOS	28
3.3.1.Disponibilidad de vegetación y selección por las hormigas	28
3.3.2.Ensayos de preferencia de cafetería y duales	29
3.3.2.1. Ensayos de cafetería.....	29

3.3.2.2. Ensayos duales.....	29
3.3.3. Ensayo a campo de plantaciones con y sin vegetación.....	31
3.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	32
CAPÍTULO 4: ESTÍMULO PULL –NARANJA COMO ATRAYENTE	34
4.1. INTRODUCCIÓN.....	34
4.2. METODOLOGÍA	35
4.2.1. Atracción por diferentes partes de la naranja.....	35
4.2.2. Atracción por volátiles de diferentes partes de la naranja	36
4.2.3. Colecta e identificación de compuestos volátiles	36
4.2.4. Ensayos de comportamiento con compuestos volátiles	37
4.2.4.1. Preferencia con pulpa de naranja.....	37
4.2.4.2. Orientación con pulpa de naranja.....	38
4.2.4.3. Olfatómetro de ambiente estacionario con aceite esencial de naranja.....	39
4.2.5. Atracción por naranja en el campo	39
4.2.5.1. Atracción por pulpa de naranja.....	39
4.2.5.2. Atracción por aceite esencial de naranja.....	40
4.2.6. Aceite de naranja como refuerzo de atracción en vegetación palatable.....	41
4.3. RESULTADOS	42
4.3.1. Atracción por diferentes partes de la naranja.....	42
4.3.2. Atracción por volátiles de diferentes partes de la naranja	42
4.3.3. Colecta e identificación de compuestos volátiles	43
4.3.4. Ensayos de comportamiento con compuestos volátiles	43
4.3.4.1. Ensayo de preferencia con pulpa de naranja.....	43
4.3.4.2. Ensayo de orientación con pulpa de naranja.....	45
4.3.4.3. Ensayo con olfatómetro de ambiente estacionario con aceite esencial de naranja	45
4.3.5. Atracción por naranja en el campo	46
4.3.5.1. Atracción por pulpa de naranja.....	46
4.3.5.2. Atracción por aceite esencial de naranja.....	46
4.3.6. Aceite de naranja como refuerzo de atracción en vegetación palatable.....	47
4.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	47
CAPÍTULO 5: ESTRATEGIA PUSH-PULL	49
5.1. INTRODUCCIÓN.....	49
5.2. METODOLOGÍA	50

5.2.1. Ensayos en laboratorio	50
5.2.2. Ensayos en el campo por colonia: Farnesol + Naranja	52
5.2.3. Ensayos en el campo en plantaciones de sauces jóvenes: Farnesol y Barrera mecánica + Vegetación de crecimiento espontáneo	53
5.3. RESULTADOS	55
5.3.1. Ensayos en laboratorio	55
5.3.2. Ensayos en el campo por colonia: Farnesol + Naranja	55
5.3.3. Ensayos a campo en plantaciones jóvenes: Farnesol y Barrera mecánica + Vegetación	56
5.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	58
CONSIDERACIONES FINALES.....	61
BIBLIOGRAFIA.....	65

INTRODUCCIÓN GENERAL



El Delta del Paraná se ubica en la porción final de la Cuenca del Plata, posee 1.750.000 ha y se caracteriza por ser un ecosistema formado por un mosaico de humedales¹ con diferentes hidroperíodos, fuentes de agua y diversidad de vegetación (Malvárez, 1999; Kalesnik & Quintana, 2006). Este estudio se realizó en la porción más austral de este sistema, denominada *Bajo Delta* (Bonfils, 1962) (33° 45'S; 58° 51'O), esta es una planicie inundable que posee 4500 km² de tierra continental (la parte sur de la provincia de Entre Ríos) y 3000 km² de islas (región Norte de la provincia de Buenos Aires) (Y. V. Sica *et al.*, 2016). Los humedales son ecosistemas sumamente diversos en flora y fauna, y además son identificados como ecosistemas proveedores de servicios ecosistémicos: regulación de gases, del clima, regulación de eventos extremos, proveedores del suministro de agua, el ciclado de nutrientes, el control de erosión, la provisión de alimentos y materia prima, la retención de contaminantes, entre otros (Gardner *et al.*, 2015). Esta zona fue inventariada como uno de los humedales más extensos de la Argentina (Bó & Quintana, 2017).

El Bajo Delta ha tenido intervención humana intensa desde mediados del siglo XIX, cuando ocurrió la mayor ocupación de las islas, sobre todo por inmigrantes europeos, con fines productivos. Hasta 1950 la fruticultura y la producción asociada al mimbre eran las actividades principales, con algo de forestación en las tierras más elevadas (albardones). A causa de eventos de inundación extraordinarios (sobre todo las inundaciones del '59 y del '82-'84), que causaron pérdidas enormes en la producción de frutas y gran éxodo poblacional, y a los impulsos del Estado Nacional para la producción forestal (Ley Nacional Nº 25.080 de Inversiones para Bosques Cultivados - 1999, prorrogada en el año 2008 por la Ley Nacional Nº 26.432 por 10 años más) se cambió la producción frutícola y diversificada, por el monocultivo de Salicáceas (sauces, *Salix* spp. y álamos, *Populus* spp.) (Fracassi *et al.*, 2017; Camarero *et al.*, 2018). Estos árboles poseen crecimiento rápido (10 - 16 años) comparados con otras producciones forestales, y su madera tiene varios destinos comerciales: triturado (pasta celulósica y tableros de partículas), aserrado (madera para pallets, encofrados, muebles), debobinado (láminas continuas de madera para la elaboración de fósforos, palitos de helado), leña (con los desperdicios de

¹ Tomando la definición de humedales que emergió por consenso de los participantes del Taller "Hacia un Inventario Nacional de Humedales" organizado por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación el 14 y 15 de septiembre de 2016: "un humedal es un ambiente en el cual la presencia temporaria o permanente de agua superficial o subsuperficial causa flujos biogeoquímicos propios y diferentes a los ambientes terrestres y acuáticos. Rasgos distintivos son la presencia de biota adaptada a estas condiciones, comúnmente plantas hidrófitas, y/o suelos hídricos o sustratos con rasgos de hidromorfismo".

los aserraderos) y en menor proporción, postes y tutores para construcciones económicas (Borodowski, 2006).

En sus comienzos, las salicáceas no se plantaban hasta más de 1.000 m hacia el interior de las islas, y ya se utilizaban sistemas de drenajes y desagües tanto para la producción forestal, como para la protección ante inundaciones (INTA, Delta del Paraná, 1973). Estos incluían zanjas, ataja-repentes y diques/alteos (elevaciones artificiales del terreno), todos contruidos de forma artesanal por los productores (Fracassi *et al.*, 2013). En su conjunto, a estos sistemas se los llama “*abiertos*”. Luego con la llegada de inversores privados con mayor capital (como Papel Prensa, FAPLAC o Alto Paraná) comenzaron a realizarse obras de endicamientos con cierre completo de predios, “*sistemas cerrados*”, que permitieron la incorporación de maquinaria, seguridad ante eventos de inundación, y sobre todo, mayor superficie dedicada al monocultivo de salicáceas (Fracassi *et al.*, 2014; Camarero *et al.*, 2018).

En la actualidad, aproximadamente 83.000 ha de la cubierta vegetal original del Delta han sido reemplazadas por plantaciones de Salicáceas (Borodowski, 2017). Con respecto a la modificación de la tierra, para el año 2013 se relevaron más de 240.000 ha de humedales con endicamientos del tipo “*cerrado*” para distintos fines, lo que representa aproximadamente el 14% de la superficie total de dicho sector; 36,6% de esas hectáreas endicadas son destinadas para producción forestal (Minotti & Kandus, 2013). En la provincia de Buenos Aires la superficie forestada alcanza las 68.043 ha, de las cuales cerca del 88,3% corresponde a salicáceas ubicadas en el Delta del Río Paraná (Borodowski, 2017). En esta región se diferencia una porción que ha sido denominada *Zona Núcleo Forestal* (en los partidos de Campana y San Fernando, concentrada principalmente entre el cruce de la RN 12 con las islas hacia el norte y el Canal de la Serna hacia el sur) por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), para designar al lugar con mayor producción y productividad en la actividad forestal.

Las islas de esta zona estaban conformadas originalmente por extensos bajos, permanentemente inundados en su interior, cuyas comunidades vegetales típicas eran juncales y pajonales, denominado según su patrón de paisaje como “*Pajonales y Bosques del Bajo Delta*” (Malvárez, 1999). Estos bajos se encontraban rodeados por albardones perimetrales sobre los cuales se asentaba un bosque ribereño de alta diversidad biológica, denominado “*monte blanco*” (Fracassi *et al.*, 2013). Como resultado de la modificación de la estructura de la vegetación y las condiciones hidrológicas del sistema del humedal debido a los endicamientos, esta zona del Delta se ha enfrentado a la disminución, e incluso desaparición de los ambientes naturales, con la consecuente pérdida de hábitat para la flora y fauna nativa (Fracassi *et al.*, 2017). Esta situación ha afectado sobre todo a las especies endémicas de

pajonales como la pajonalera de pico recto (*Limnocytes rectirostris*) y el ratón del Delta (*Deltamys kempii*), entre otros (Fracassi *et al.*, 2014).

Los cambios hacia la homogeneización del paisaje promueven que las especies más generalistas aumenten su población y sus oportunidades de colonizar mayor territorio (Fracassi *et al.*, 2014). De esta forma, muchos herbívoros se transforman en un problema para la producción.

Las hormigas cortadoras de hojas (HCH) del género *Acromyrmex* son uno de los principales herbívoros que atacan a las salicáceas durante las etapas de vivero (estaquero) e implantación. Poseen una relación simbiótica con un hongo basidiomiceto del cual se alimentan, y que está conformado por dos géneros: *Leucoagaricus* y *Leucocoprinus* (Agaricaceae: Leucocoprinae) (Mueller *et al.*, 1998). Las hormigas cultivan este hongo recolectando hojas frescas y acondicionándolas para generar un sustrato adecuado para su desarrollo (Hölldobler & Wilson, 2009). En el Delta del Paraná se encuentran 2 especies de HCH según su distribución, *Acromyrmex ambiguus* Emery y *Acromyrmex lundii* Guerin (Farji Brener & Ruggiero, 1994), ambas se encuentran estrechamente relacionadas con las producciones forestales de salicáceas (Sánchez-Restrepo *et al.*, 2019). *A. lundii* se caracteriza, en esta zona, por armar sus nidos en la base de los árboles (es una especie con mucha plasticidad a la hora de nidificar (Bollazzi *et al.*, 2008)), esto le da la capacidad de sobrevivir a las inundaciones temporales que ocurren en el Bajo Delta, ya que rápidamente pueden mover sus nidos arriba de los árboles, y evitar la mortalidad del hongo y las larvas (Sánchez-Restrepo *et al.*, 2019). *A. ambiguus* arma sus nidos con un domo de hojas secas arriba para controlar las condiciones climáticas a la que se exponen el hongo y las crías (Sánchez-Restrepo *et al.*, 2019). Ambas especies disponen la/las cámara/s del hongo en un nivel superficial del terreno, ya que la humedad y la temperatura del suelo, así como la cobertura generada por el follaje de las plantaciones de árboles, les proporcionan un microhábitat que maximiza la tasa de crecimiento de las colonias (Roces & Kleineidam, 2000; Bollazzi *et al.*, 2008).

Además de las condiciones climáticas favorables para nidificar, la simplificación del paisaje provocada por el monocultivo, genera que las HCH posean una oferta continua de recursos nutritivos para el hongo, sumado a la disminución de enemigos naturales que se encuentran en menor cantidad y diversidad que en un ecosistema natural (Altieri & Letourneau, 1982; Zanetti *et al.*, 2000; Letourneau *et al.*, 2011). Este contexto fomenta el aumento de la población de hormigas presentes en las plantaciones forestales, en donde la única opción de corte es el cultivo en sí, convirtiendo a las hormigas en “plaga”², y generando graves problemas para los productores (Zanetti *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2020).

² Definición en Dent (1993): “Cualquier organismo es considerado *plaga* cuando causa daño al hombre, a sus cultivos, animales o a la propiedad. En términos agrícolas, se clasifica como plaga cuando el daño que causa al

Hasta ahora, el control de las HCH en los trópicos y subtrópicos se ha realizado, casi exclusivamente, mediante cebos tóxicos derivados de insecticidas o fungicidas convencionales y de amplio espectro. La mayoría de ellos contienen sulfloramida (sulfonamida fluoro alifática) y fipronil (fenilpirazol) como principios activos, estos compuestos son peligrosos para animales no blanco, el medio ambiente, así como también la salud humana (Tingle *et al.*, 2003; Peden-Adams *et al.*, 2007; Giesel *et al.*, 2012; Bonmatin *et al.*, 2015; Löfstedt Gilljam *et al.*, 2016; Al-Badran *et al.*, 2018; Paredes *et al.*, 2019). El uso de estos compuestos ha sido restringido por gobiernos y agencias de certificación de productos forestales, como el Forest Stewardship Council (FSC) (Zanuncio *et al.*, 2016). La utilización de la sulfloramida, además, ha sido prohibida por la Convención de Estocolmo (Löfstedt Gilljam *et al.*, 2016). En el Delta del Río Paraná, donde la presencia de agua es permanente y el suelo presenta una alta humedad, los cebos se hinchan en solo un día, y se vuelven poco atractivos para las hormigas. Estos cebos húmedos, al no ser retirados por las HCH, permanecen en el campo y sus componentes tóxicos drenan al río (Bonmatin *et al.*, 2015; Löfstedt Gilljam *et al.*, 2016). Asimismo, las HCH pueden aprender a evitar los cebos una vez que identifican que son tóxicos para la colonia (Saverschek *et al.*, 2010).

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) surge en los años 70, justamente como estrategia para disminuir la cantidad de pesticidas utilizados para manejar plagas. Si bien desde fines de la década de los '50 y principios de los '60 ya se hablaba de "Control integrado" (Stern *et al.*, 1959) o "Manejo de plagas" (Geier & Clark, 1961), luego de la publicación del libro "*Primavera Silenciosa*" de Rachel Carson el 1962, donde se exponen los peligros de los agrotóxicos en la salud humana, es cuando la FAO y los organismos públicos comienzan a aplicar esta estrategia en sus planes de manejo (Dhaliwal *et al.*, 2004). La definición de MIP fue cambiando a través del tiempo, dependiendo del objetivo que se le daba, y aun hoy se siguen usando varias definiciones. En este trabajo se toma como marco teórico la definición redactada por Kogan (1998): "El Manejo Integrado de Plagas es un sistema de apoyo a la toma de decisiones para la selección y uso de tácticas en el control de plagas, individuales o coordinadas armoniosamente en un estrategia de manejo, basada en un análisis de costo/beneficio que tenga en cuenta los intereses e impactos en los productores, la sociedad y el medio ambiente".

Dentro del MIP se encuentra la estrategia "*Push-pull*", la cual se diseñó por primera vez para manejar las orugas del género *Helicoverpa* en plantaciones de algodón (Pyke *et al.*, 1987), y posteriormente para *Delia antiqua*, la "mosca de la cebolla" (Miller & Cowles, 1990). La estrategia se basa en la manipulación comportamental de la plaga: se utilizan estímulos repelentes para disuadir o enmascarar la producción ("*push*", empujar), y en simultáneo, estímulos atrayentes para movilizar la plaga hacia otra zona lejos del cultivo ("*pull*", jalar). La utilización en simultáneo de ambos estímulos sinergiza sus

cultivo o a los animales es suficiente para reducir el rendimiento y/o calidad del producto cosechado, en una cantidad tal que es económicamente inaceptable para el productor".

efectos para proteger la producción, direccionando el movimiento y la distribución de los insectos (Cook *et al.*, 2007). Los estímulos utilizados para cada una de las partes de la estrategia (*push* y *pull*) pueden actuar a corta o a larga distancia, la elección de cada tipo de estímulo va a depender del conocimiento biológico de la plaga a manejar y de cómo esta selecciona su recurso. Los estímulos de larga distancia (relacionados con claves visuales u olfativas), están accesibles antes de que los insectos entren en contacto con el recurso y generalmente son la primera línea de defensa (ej.: colores atrayentes, feromonas de alerta o agregación, volátiles del hospedador); los estímulos de corta distancia (relacionado con claves táctiles y gustativas) son accesibles una vez que los insectos entran en contacto con el recurso, y muchas veces son necesarios para que lo abandonen (disuasorios de alimentación u oviposición, tricomas y ceras en la superficie de las hojas, compuestos tóxicos) (Cook *et al.*, 2007; Eigenbrode *et al.*, 2016). Eigenbrode *et al.* presentaron, en el 2016, un marco conceptual mecanicista de los sistemas *push-pull* basado en los tipos de claves, sus rangos espaciales, y el comportamiento de selección de la plaga. Este marco presenta 4 tipos de *push-pull* establecidos por las combinaciones entre rangos de acción (corta o larga distancia) del estímulo *push* y del estímulo *pull*, y recomienda pensar en todas las posibles combinaciones de estímulos, para que el diseño se ajuste mejor a las claves utilizadas por la plaga.

La estrategia *push-pull* más exitosa, y el único ejemplo que actualmente se está utilizando en la práctica, se desarrolló en plantaciones de maíz en África subsahariana para el manejo de lepidópteros minadores de tallo de la familia Noctuidae. Aproximadamente el 80% de la población humana de esta zona de África son agricultores de subsistencia que dependen de la producción de cereales para comida, ingresos, y trabajo; y el ataque a las producciones de estos pequeños productores, tanto por los minadores, como por una planta parásita del género *Striga*, puede destruir completamente sus campos de cereales (Khan *et al.*, 2010). Para el diseño de la estrategia *push-pull* se seleccionaron, como estímulo *pull*, dos plantas de la familia Poaceae que crecen espontáneamente en la zona, y que resultan atrayentes de oviposición para estos insectos: *Pennisetum purpureum* (“Pasto Napier” o “Pasto elefante”) y *Sorghum sudanense* (“Pasto Sudán”), que además tienen la característica de reducir la población de esta plaga ya que las larvas no sobreviven criándose en ellas (Khan *et al.* 2006; Van den Berg & Van Hamburg, 2015). Como estímulo *push* se utilizaron dos especies de leguminosas del género *Desmodium*, que ya eran plantadas por los productores en interseembra con el maíz, y no son atacadas por los minadores. Este diseño resultó ser muy exitoso: se reducen los daños causados por el insecto minador, se aumenta el rinde de la producción, y conjuntamente, se descubrió que las plantas de *Desmodium* evitan que la planta parásita *Striga* infeste el campo (Khan *et al.*, 2009), además de mejorar el rendimiento del cultivo fijando nitrógeno y conservando la humedad del suelo (Midega *et al.*, 2013). Esta estrategia se ha difundido como práctica en toda la región oeste de Kenia a través de

diferentes intervenciones como métodos de aprendizaje de agricultor a agricultor, visitas de campo, escuelas de agricultores (Amudavi *et al.*, 2009; Murage *et al.*, 2011), y se está utilizando exitosamente también en los cultivos de sorgo (Khan *et al.*, 2010; Ogot *et al.* 2018).

El *push-pull* ha sido evaluado en sistemas forestales para controlar el escarabajo del pino de montaña *Dendroctonus ponderosae* en *Pinus contorta* utilizando diferentes diseños (Lindgren & Borden, 1993; Borden *et al.*, 2006; Gillette *et al.*, 2012), con buenos resultados. Sin embargo, nunca se ha evaluado en hormigas cortadoras de hojas ni en ninguna otra especie de insecto con organización social.

El trabajo realizado y presentado en esta tesis tuvo como **objetivo** evaluar productos y recursos naturales como estímulos atrayentes y repelentes de hormigas cortadoras de hojas para utilizarlos en una estrategia de manejo integrado de tipo *push-pull* en plantaciones jóvenes de salicáceas del Bajo Delta del Río Paraná. La **hipótesis** es que la estrategia *push-pull*, utilizando los estímulos que fueron exitosos en los ensayos de atracción y repelencia, disminuye el ataque de las hormigas cortadoras de hojas a los sauces.



CAPÍTULO 1: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

1.1. Recolección y mantenimiento de colonias de *Acromyrmex ambiguus*.

Las colonias de *Acromyrmex ambiguus* se colectaron en la Estación Experimental Delta del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en el distrito de Campana en Buenos Aires (34°10'30.3"S 58°51'49.9"O) durante 2013 y 2014. Para la colecta, primero se ubicó el nido, los que para esta especie son bien visibles ya que forman un montículo alto con tierra y material orgánico seco (Fig. 1), luego se



Fig. 1. Hormiguero de *Acromyrmex ambiguus*

despejó cuidadosa mente el material orgánico de la parte superior hasta observar la honguera (conjunto de hongo simbiote, obreras, estados inmaduros y reina). La honguera se colectó con una cuchara esterilizada con alcohol y se colocó en recipientes plásticos (23 cm x 14 cm x 7 cm). Se utilizaron tantos recipientes como fueron necesarios para colectar la mayor biomasa posible de la honguera, y de esta forma tener mayor seguridad de que se está colectando a la reina, la cual asegurará la continuidad de la colonia en laboratorio. Estos recipientes, que a partir de ahora se denominarán “*cámaras del hongo*”, fueron colocados dentro de una caja de mayor tamaño (30 cm x 44 cm x 30 cm) que actuó como “*arena de forrajeo*”. Esta última generalmente se conecta por tubos transparentes (1,5 cm de diámetro y 15 cm de largo aprox.) a otra igual para que los individuos de la colonia tengan mayor espacio para recorrer. También se dispuso dentro de la arena un recipiente que actuó como “*cámara de desechos*” donde las hormigas depositaban lejos de las cámaras del hongo, todo lo que pueda ser perjudicial para el mismo (Fig. 2).

Las colonias se mantuvieron en una cámara de cría bajo un fotoperíodo de 12:12 hs luz-oscuridad, una temperatura de 23-25 °C y 60% de humedad relativa. Las colonias se alimentaron tres veces a la semana con hojas frescas de fresno (*Fraxinus* spp) o álamo (*Populus* spp.) durante la primavera y el verano, y hojas frescas de jazmín amarillo (*Jasminum meznayi*) durante el otoño y el invierno. Además, se les ofreció cáscara de manzana, copos de avena, harina de maíz, arroz, y agua *ad libitum* durante todo el año.

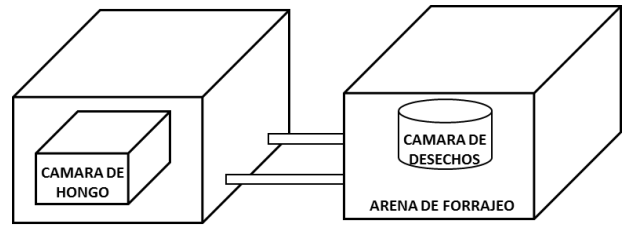


Fig. 2. Esquema de cómo se mantienen las colonias en laboratorio.

Para todos los bioensayos con colonias, la arena de forrajeo se conectó por un puente hecho de madera delgada, a otro recipiente que actuó como segunda arena de forrajeo (33 cm x 46 cm x 12 cm). Todos los recipientes de plástico con hormigas fueron recubiertos con vaselina en la parte superior de las paredes para evitar su escape.

1.2. Establecimiento de subcolonias



Las mismas consistieron en una porción del hongo de la colonia que se colocó en un recipiente redondo de plástico (10,5 cm de diámetro x 10 cm de altura), con aproximadamente 350 hormigas obreras (N=6), con un ancho medio de la cabeza (entre los límites exteriores de los ojos) de 1,75 mm ($\pm 0,1$ mm, N=180). Este contenedor se conectó a una caja de plástico rectangular (23 cm x 14 cm x 7 cm), que actuó como arena de forrajeo, por tres tubos de plástico transparente (1,2 cm de diámetro y 15 cm de largo).

CAPÍTULO 2: ESTÍMULO PUSH - REPELENTE



2.1. INTRODUCCIÓN

El estímulo *push*, dentro de la estrategia *Push-pull*, cumple el rol de proteger el cultivo alejando a la plaga de éste. Hay muchos tipos de repelentes que se clasifican según la metodología de acción (químicos *-contacto o volátil-*, mecánicos, sonoros, visuales), o pueden clasificarse también por su rango de acción (de corto o largo alcance) dependiendo de la naturaleza del estímulo. Los estímulos de largo alcance afectan el reconocimiento del cultivo por la plaga y están relacionados con claves visuales y volátiles (variedad de colores en los cultivos, volátiles de otras plantas acompañantes, feromonas antigregarias o de alarma). Los de corto alcance afectan la aceptación de la planta por el herbívoro (baja o falta de palatabilidad, disuasivos de oviposición, feromonas disuasivas) (Cook *et al.*, 2007).

A los compuestos químicos de origen natural que median las interacciones entre organismos se los denomina *semioquímicos*, dentro de éstos se encuentran los *aleloquímicos* responsables de las interacciones interespecíficas (contrario a las *feromonas* que actúan a nivel intraespecífico) (Schooven *et al.*, 2005). Los metabolitos secundarios de las plantas, denominados de esta forma ya que no poseen una función metabólica conocida y no son estrictamente esenciales para su funcionamiento cotidiano, pueden actuar como repelentes químicos naturales, y cuando cumplen este cometido se los denominan *alomonas*. Algunas de las funciones de estos compuestos es otorgarle a la planta una mayor capacidad de resistencia frente a los herbívoros, ya que generan que las mismas no sean palatables o incluso tóxicas para algunos insectos plaga. Cuando estos compuestos no poseen toxicidad, sino que impiden que los herbívoros consuman las plantas, se los denomina disuasivos ("*deterrents*") (Walters, 2011).

Varias especies de plantas o sus derivados fueron evaluadas para el manejo de hormigas cortadoras de hojas. *Tihtonía diversifolia*, también conocida como "*Botón de Oro*", es una planta invasiva perenne o anual con forma de arbusto, nativa de América del Norte y Central. Esta planta fue reportada como repelente de *Atta cephalotes* en sistemas silvopastoriles en Colombia (Giraldo, 2005), luego se probó su efecto fungicida sobre colonias en laboratorio (Valderrama-Eslava *et al.*, 2009), la actividad insecticida de sus extractos sobre obreras (Castaño-Quintana *et al.*, 2013), y la reducción de la actividad de nidos en campo cuando eran tratados con un *mulch*

(cobertura orgánica) de hojas de esa planta (Rodríguez *et al.*, 2015). Estudios de Gonçalves (1944) y más tarde, Bueno *et al.* (1995), revelaron que en nidos de *Atta sexdens rubropilosa* mantenidos en laboratorio, y alimentados exclusivamente con hojas de sésamo (*Sesamum indicum*), ocurría una reducción gradual del número de individuos y de la masa del hongo. El árbol de Neem, *Azadirachta indica*, también fue estudiado por sus conocidos compuestos insecticidas, resultando ser tóxico para las obreras de la especie *Atta sexdens rubropilosa* (Santos-Oliveira *et al.*, 2006). Otras plantas también fueron evaluadas: como por ejemplo el frijol de chancho (*Canavalia ensiformis*) en colonias de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* (Valderrama-Eslava *et al.*, 2009); Caángay (*Ageratum conyzoides*), Cilantro (*Coriandrum sativum*), y menta (*Mentha piperita*), en extractos de diferentes concentraciones inhibieron el crecimiento del hongo (Morais *et al.*, 2015); Ricino (*Ricinus communis*) en extractos con diferentes solventes, fungicida y tóxico para obreras de *Atta sexdens* (Bigi *et al.*, 2004) y *Acromyrmex lundii* (Caffarini *et al.*, 2008).

Dentro del grupo de moléculas responsables de la resistencia de las plantas a insectos fitófagos, se encuentran los Terpenos: estos pueden clasificarse en monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos y esteroides, según el número de carbonos que los componen. Los sesquiterpenos (formados por 15 carbonos) representan el grupo más grande de los terpenos y son componentes comunes de los aceites esenciales de las plantas. Muchos de estos compuestos fueron identificados y aislados de extractos vegetales y están informados como repelentes de hormigas (dos Santos *et al.*, 2013). Okunade y Wiemer (1985) aislaron sesquiterpenos de las hojas de “tabaquillo” (*Eupatorium quadrangulare*), que resultaron repelentes para *Atta cephalotes*. Howard *et al.* (1988) evaluaron diferentes aspectos de la toxicidad de terpenos aislados de plantas nativas del área de distribución de *Atta cephalotes*: el cariofileno no fue tóxico para las obreras, pero si disminuyó el crecimiento del hongo. El nerolidol y el cariofileno epóxido mostraron efectos negativos tanto en la supervivencia de obreras como en el crecimiento del hongo. Los tres compuestos mostraron correlación entre la magnitud de la toxicidad y su efecto repelente, siendo el nerolidol el más efectivo (Howard, *et al.*, 1988).

El farnesol es un sesquiterpeno que está presente en muchos aceites esenciales de plantas, como *Pluchea dioscoridis* y *Pittosporum undulatum* (Grace, 2002; Medeiros *et al.*, 2003), y también se lo ha encontrado en las glándulas mandibulares de las especies de hormigas cortadoras del género *Atta* con la presunta función de feromona de alarma (Schildknecht, 1976). Es obtenido industrialmente de la semilla de zapallo (*Cucurbita maxima*) o del insecto *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Curculionidae) (Palacios y Gladstone, 2003), y se lo utiliza con fines comerciales en fragancias y alimentos. Este compuesto se ha evaluado en plantaciones de

árboles cítricos para repeler a la hormiga argentina (*Linepithema humile*). En los árboles infestados por áfidos, la hormiga argentina aprovecha el recurso “atendiendo” a estos insectos (los protege de depredadores a cambio de excreciones azucaradas), y como consecuencia, los áfidos aumentan su población, y el daño que producen sobre la plantación. En ensayos a campo, el farnesol fue dispuesto con un vehículo adherente alrededor del tronco del árbol a modo de barrera, y resultó efectivo interrumpiendo el camino de forrajeo de las hormigas argentinas a dosis de 0,8 y 2 g por árbol, evitando que éstas llegaran a los áfidos por un periodo de 2 a 3 meses (Shorey *et al.*, 1992, 1996). Palacios y Gladstone (2003) evaluaron la repelencia del farnesol en hormigas cortadoras de la especie *Atta mexicana*, y encontraron que éstas tendían a evitarlo.

El uso de semioquímicos repelentes puede ayudar a proteger a los cultivos, sobre todo en las etapas del desarrollo en los que son más vulnerables, como los árboles jóvenes de sauces y álamos, que pueden morir por defoliación continua al ser atacados por hormigas cortadoras de hojas en las plantaciones comerciales (Pérez *et al.*, 2011; Della Lucia *et al.*, 2014).

El trabajo realizado y presentado en este capítulo, tuvo como **objetivo** evaluar el efecto del farnesol en *Acromyrmex ambiguus*, para ser utilizado como estímulo *push* en una estrategia *Push-pull*. La **hipótesis** planteada es que el farnesol tiene efecto repelente en estas hormigas cortadoras. Se **predice** que cuando el farnesol está presente formando una barrera química alrededor de las plantas jóvenes de sauce, las hormigas cambian su comportamiento de recolección, evitando esas plantas, y se reduce el daño al cultivo.

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1. Evaluación de repelencia del Farnesol

Para este bioensayo se utilizaron subcolonias. La evaluación consistió en colocar 12 discos de papel de filtro (0,5 cm de diámetro) en un diseño de cuadrícula, equidistantemente distribuidos en 4 columnas y 3 filas en la arena de forrajeo (Fig. 3). La mitad de los discos fueron tratados con una solución de farnesol y etanol (*discos tratados*), y la otra mitad fueron tratados sólo con etanol (*discos control*). Se probaron tres concentraciones de farnesol (SIGMA Aldrich): 1, 5 y 10 mg/ml. Tanto los discos tratados, como los controles, se embebieron con 3 µl de cada concentración de aceite esencial o solo solvente (etanol), respectivamente. Los discos se

colocaron aleatoriamente en cada posición de la cuadrícula en la arena de forrajeo (Fig. 3). Se permitió el ingreso de las hormigas a la arena, y se registró el orden y el tipo de disco recolectado. Se tomaron los primeros 6 discos colectados como frecuencia observada. Se utilizaron 18 subcolonias, obtenidas de 3 colonias madre (6 de cada una), y se sumaron



Fig. 3. Ensayo con metodología de grilla en subcolonias.

los resultados provenientes de cada colonia. Los primeros 36 discos seleccionados por cada colonia (6 discos x 6 subcolonias) se analizaron mediante una prueba de heterogeneidad de χ^2 .

2.2.2. Rango de acción del farnesol

Para evaluar si el efecto repelente del farnesol es causado por claves volátiles (señal de olor) o por claves de contacto, se realizaron dos ensayos de elección diferentes con subcolonias. En ambos, las hormigas podían elegir entre dos estaciones de alimentación diferentes, una tratada con farnesol y otra como control. Estas estaciones consistían en pequeñas jaulas hechas de una malla plástica (2 cm de diámetro y 2,6 cm de alto) con un recipiente con copos de avena en la parte superior, como material de colecta de interés (Fig. 4). Las hormigas debían subir a la jaula para alcanzar los copos de avena. El tratamiento con farnesol consistió



Fig.4. Disposición de los hilos en las jaulas según el ensayo. Izquierda: claves volátiles. Derecha: claves de contacto.

en hilo de algodón de 25 cm tratado con 10 mg de farnesol en 100 mg de lanolina (mezcla comercial de lípidos -colesterol y ésteres de ácidos grasos- producidos naturalmente por las glándulas sebáceas de los mamíferos), y el hilo de control se trató con 100 mg de lanolina sola. Se utilizó como referencia de esta metodología el trabajo de Shorey *et al.* (1996) donde se describe el uso del hilo de algodón. Los 100 mg de lanolina se derritieron en un vidrio reloj a 70°C en una placa calentadora, y luego se le agregaron los 10 mg de farnesol (11 μ L), revolviendo hasta que se incorporaron en la lanolina. A esta mezcla, aun en estado líquido, se agregó el hilo de algodón y se embebió completamente en la misma. En el caso del *control*, una vez que la lanolina se derritió, solo se le agregó el hilo.

- ENSAYO CON CLAVES VOLÁTILES: En este ensayo, se colocaron los hilos de algodón dentro de las jaulas. Las hormigas podían subir hasta los recipientes con avena sin entrar en contacto con el hilo.

- ENSAYO CON CLAVES DE CONTACTO: En este otro ensayo, los hilos de algodón, tratado y control fueron colocados externamente en la línea media de la jaula, formando una banda de 0,5 cm aprox., con lo cual las hormigas debían entrar en contacto con el hilo, y cruzarlo para alcanzar los recipientes con los copos de avena.

La variable respuesta medida fue el número de hormigas en contacto con el recipiente de avena. Esta se registró cada dos minutos, durante cuarenta minutos. El número de hormigas en contacto con cada opción se analizó mediante una prueba de heterogeneidad de Chi². Se utilizaron 18 subcolonias, obtenidas de 3 colonias madre (6 de cada una).

2.2.3. Duración del efecto repelente

Para estimar el tiempo de efectividad de la repelencia del farnesol se realizaron ensayos con 3 colonias enteras. Cada colonia fue conectada por un puente de madera a una arena de forrajeo adicional en donde se realizó el ensayo. Se utilizaron estacas de *Salix babylonica* var. *Sacramenta*

"Soveny Americano" de 22 cm de alto x 1,5 cm de diámetro. A cada estaca se le agregó un pequeño recipiente redondo (2 cm de diámetro) con copos de avena en la parte superior, el cual fue continuamente relleno para generar que el recurso estuviese disponible *ad libitum* (Fig. 5). El ensayo consistió en ofrecer a las hormigas dos estacas, una *control* y otra *tratada*, ubicadas

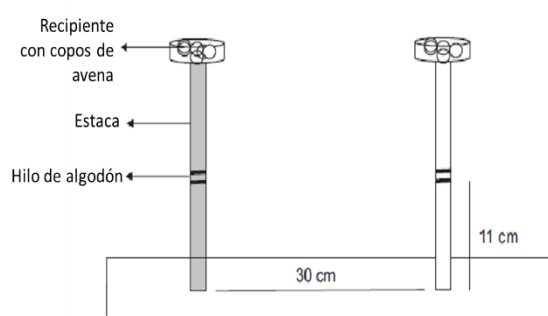


Fig. 5. Esquema de ensayo con estacas

en el centro de la arena, separadas por 30 cm entre sí. Se utilizó nuevamente la metodología del hilo de algodón de 25 cm, el cual fue colocado en la línea media de cada estaca (a los 11 cm de altura aproximadamente), dándole varias vueltas, formando una banda de 1 cm (Fig. 5). El hilo de algodón de la *estaca control* se embebió con 100 mg de lanolina, y el hilo de la *estaca tratada* se embebió con tres dosis de farnesol: 10, 50 y 100 mg, mezclados en 100 mg de lanolina. La

mezcla de lanolina con farnesol y la incorporación de ésta en los hilos, así como también la lanolina sola al hilo control, se realizó con la misma metodología que en el ensayo anterior. Se registró el número de hormigas cruzando las bandas generadas por los hilos en cada estaca, independientemente de que se dirigieran hacia arriba o hacia abajo, con o sin carga (Shorey *et al.*, 1996). Se realizaron diez observaciones por día, de 1 minuto cada una, cada cuarenta minutos de 9 a 16 hs, durante un período de cinco días. Se evaluaron las tres dosis de farnesol en cada colonia. Los datos registrados se utilizaron para calcular el **Porcentaje Repulsión (PR)** por la siguiente fórmula: $PR (\%) = (Nc - 50)$, donde Nc es el porcentaje de hormigas presente en las estacas *control*. Los valores positivos (+) expresaron repelencia y los valores negativos (-) atracción (Talukder y Howse, 1994). Los datos de **PR** se analizaron mediante un ANOVA de medidas repetidas (SAS 2012). La dosis y el tiempo de muestreo se incluyeron como variables fijas, y las colonias como variable aleatoria. Los grados de libertad corregidos del denominador se obtuvieron usando el ajuste de Kenward-Roger (opción DDFM = KR de la declaración MODELO). Los **PR** se compararon para cada dosis y tiempo de muestreo con una prueba *a posteriori* de Tukey.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Evaluación de repelencia del Farnesol

A pesar de existir una tendencia a recolectar discos control en lugar de tratados con 1 mg/ml de farnesol, la diferencia no fue significativa ($\chi^2 = 4,19$; gl = 2; valor-p = 0,12). En las dosis probadas de 5 y 10 mg/ml las hormigas prefirieron significativamente recolectar los discos *control* por sobre los *tratados* (5 mg/ml: $\chi^2 = 8,04$; gl = 2; valor-p = 0,018 y 10 mg/ml: $\chi^2 = 9,47$; gl = 2; valor-p < 0,009). Claramente, al aumentar la dosis de farnesol, las diferencias entre discos *control* y *tratados* recolectados fueron mayores (Fig. 6). Las hormigas prácticamente no recolectaron discos tratados con 10 mg / ml de farnesol.

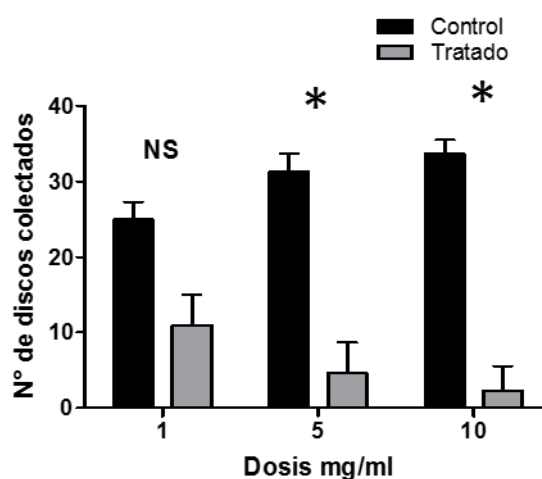


Fig.6. N° de discos colectados en cada dosis evaluada. Media y error estándar (N=3). . El * indica significancia (valor-p < 0,05), NS no significativo.

2.3.2. Rango de acción del farnesol

En el ensayo en donde se evaluaron las claves de contacto, el número de hormigas que llegaron al recipiente con copos de avena fue significativamente menor en las jaulas tratadas con farnesol

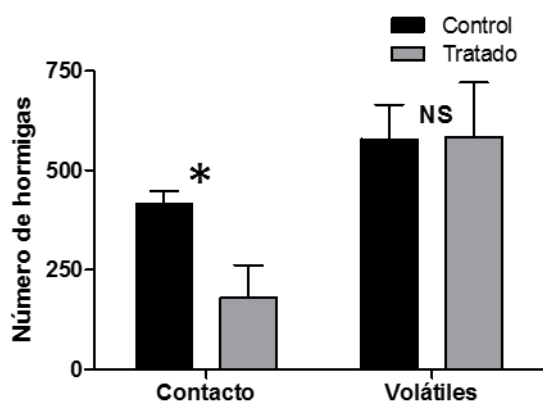


Fig.7. N° de hormigas que trepaban a las jaulas en cada uno de los ensayos. Media y error estándar (N=3). El * indica significancia (valor-p < 0,0001), NS no significativo.

en comparación con las jaulas control ($\chi^2 = 78,74$; gl = 2; valor-p < 0,0001). Sin embargo, cuando las hormigas podían subir hasta al recipiente con copos de avena, pasando por las claves volátiles del farnesol, pero sin tocarlo, las diferencias no fueron significativas entre el grupo control y el tratado ($\chi^2 = 1,3$; gl = 2; valor-p = 0,5223) (Fig.7).

2.3.3. Duración del efecto repelente

El porcentaje general de repulsión (PR) en todas las dosis y tiempos promedió $25,86 \pm 3,54$ (media \pm ES), mostrando un marcado efecto repelente del farnesol y corroborando los resultados obtenidos con los discos tratados (Fig. 8). El análisis de varianza dio significativo para el efecto *tiempo* ($F = 5,14$; gl = 4, 28; valor-p = 0,003) y para el efecto de la *dosis* ($F = 15,50$; gl = 2, 28; valor-p < 0,0001), no así para la interacción entre ambas variables ($F = 1,35$; gl = 8, 28; valor-p = 0,3). La dosis más alta de farnesol probada, 100 mg, fue más efectiva para repeler hormigas que 10 y 50 mg farnesol (valor-p < 0,05; prueba de Tukey). El farnesol fue ligeramente más repelente en los primeros tres días del ensayo en comparación con los días siguientes (valor-p < 0,05; prueba de Tukey).

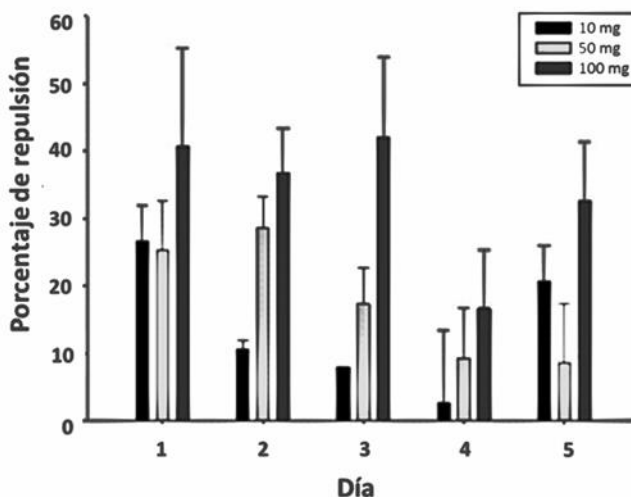


Fig.8. Efecto de repelencia del farnesol a lo largo de 5 días, en diferentes dosis. Media y error estándar (N=3)

2.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados de esta serie de ensayos demostraron que el farnesol actúa efectivamente como repelente de las hormigas cortadoras de hojas de la especie *Acromyrmex ambiguus* en condiciones de laboratorio. Esta especie se suma al efecto reportado para otra hormiga cortadora, *Atta mexicana* (Palacios y Gladstone, 2003), y para la hormiga argentina *Linepithema humile* (Shorey *et al.*, 1992, 1996).

Cuando se habla de posibles repelentes y de manejo integrado, hay que tener siempre en cuenta cómo pueden ser estos empleados en las estrategias de manejo para que sean efectivos para la plaga que se quiere manejar. Con los resultados obtenidos en el ensayo de rango de acción, se pudo concluir que el efecto repelente del farnesol en *A. ambiguus* se debe a claves de contacto. Como se mencionó en la introducción, estas claves de corto alcance afectan a la elección del herbívoro, una vez que ya está sobre la planta, o muy cerca de ella. Con lo cual el farnesol puede ser utilizado como una barrera química en los tallos de las plantas jóvenes de salicáceas evitando que las hormigas cortadoras lleguen hasta las hojas y provoquen daño a las plantas. Es importante destacar que las hormigas cortadoras de hojas son generalistas, las exploradoras (“*scouts*”) salen a buscar posibles opciones de corte, vuelven al nido con la información de la planta (cargadas con una porción de la hoja o no) para reclutar más obreras y marcan con feromonas el camino hasta ese recurso para monopolizarlo antes que otro herbívoro (Bollazzi y Roces, 2011). Si bien la aceptación de la planta como recurso depende de sus características físicas y químicas (Howard, 1987), y de la experiencia previa de las obreras (Saverschek *et al.*, 2010), la búsqueda de opciones de corte por las hormigas “*scouts*” empieza recorriendo largas distancias de forma aleatoria (Travaglini *et al.*, 2015). Si las hormigas “*scouts*” encontraran el cultivo protegido por una barrera que las repeliera de explotar ese recurso y tuvieran otras opciones atractivas (que pueden generarse por medio de un atrayente en el diseño de la plantación o por la presencia de otras fuentes de corte), se podría modificar su comportamiento, de manera tal que elijan cualquiera de las otras opciones disponibles.

Se observó que la respuesta repelente del farnesol aumenta con la dosis en diferentes dispositivos de diseño experimental. A pesar de que en los ensayos con subcolonias las dosis que se utilizaron fueron muy bajas (1, 5 y 10 mg/ml), las dos mayores fueron repelentes para esa escala inicial, donde el espacio era reducido y las hormigas tenían ambas opciones (*control* y *tratado*) muy cerca (30 cm). Cuando se aumentó la escala para trabajar con colonias enteras y evaluar la duración del efecto repelente, se observó un efecto que duró al menos 5 días para la concentración más alta utilizada, 100 mg. No obstante, las dosis de 10 y 50 mg también tuvieron un buen porcentaje de repulsión durante los primeros 3 días. Shorey *et al.* (1996) reportaron

que, en árboles de cítricos en condiciones de campo, protegidos con un hilo de algodón embebido con 40 mg de farnesol a modo de barrera, se evitaba que la hormiga argentina (*L. humile*) subiera a los mismos durante un periodo de 2 a 3 meses. Más allá de las diferencias anatómicas y fisiológicas que pueden existir entre los receptores químicos y la fisiología de estos dos géneros, el experimento que se llevó a cabo para medir la duración del farnesol como repelente en *A. ambiguus* fue realizado en condiciones de laboratorio. En el diseño solo había dos estacas como opción, con lo cual la presión de forrajeo era muy grande teniendo en cuenta que durante esos 5 días a las obreras solo se les ofreció como recurso los copos de avena que se ubicaban en la parte superior de las estacas. Los ensayos en laboratorio son muy diferentes al abanico de opciones que se da en el campo. En este último, la oferta de opciones a las cuales acudir es mayor que en las condiciones controladas del laboratorio, consecuentemente, es lógico que el efecto repelente del farnesol tenga mayor duración en los experimentos planteados por Shorey. Evaluar la duración del efecto repelente del farnesol sobre *A. ambiguus* en condiciones de campo sería un dato muy importante a medir en el futuro.

Estos resultados permitieron considerar al farnesol como un estímulo *push* adecuado en una estrategia *Push-pull*, ya que la presencia de un estímulo atrayente ayudaría a que las hormigas no necesariamente entren en contacto con el repelente.



CAPÍTULO 3: ESTÍMULO PULL – VEGETACIÓN COMO ATRAYENTE

3.1. INTRODUCCIÓN

Las hormigas cortadoras de hojas de la tribu Attini cortan material vegetal y lo usan como sustrato para el hongo que cultivan. Teniendo en cuenta la variedad de plantas que cortan y el hecho de que también pueden ingerir savia directamente de las plantas, estos insectos se consideran herbívoros polívoros o generalistas (Cherrett, 1972; Littleddyke & Cherrett, 1976; Rockwood, 1977). Sin embargo, las obreras seleccionan hojas de diferentes especies de plantas, lo que resulta en un rango de usos desde la alta preferencia por algunas especies, hasta el rechazo por otras (Hubbell *et al.*, 1983; Howard, 1990; Meyer *et al.*, 2006).

No es sorprendente, dada la biología de estos insectos que, en producciones forestales o agrícolas, donde la diversidad de plantas es muy baja y las opciones de colecta escasas, las hormigas cortadoras de hojas representen uno de los principales problemas para los productores.

Existe una gran cantidad de evidencia de que la biodiversidad, tomando el concepto descrito en el Convenio sobre Diversidad Biológica³ (Naciones Unidas, 1992), disminuye fuertemente la abundancia de herbívoros y el daño que estos causan en el cultivo (Kremen & Miles, 2012; Isbell *et al.*, 2017). El aumento de la biodiversidad de plantas en los agroecosistemas genera una reducción en la colonización de las plagas y en su tasa de crecimiento causada por: la alteración para encontrar los recursos, y el aumento en la abundancia de enemigos naturales (Isbell *et al.*, 2017). Estos efectos están regulados tanto por el control “*Bottom-up*” (de abajo hacia arriba), como por el “*Top-down*” (de arriba hacia abajo) que se dan en todas las cadenas tróficas (Begon *et al.*, 2006).

Una mayor diversidad de plantas afecta directamente a los herbívoros (sobre todo a los especialistas) por medio de una regulación “*Bottom-up*”. Esta regulación les dificulta la disponibilidad de su recurso ya sea por: 1) estímulos visuales o químicos que pueden actuar repeliendo las plagas de un cultivo, 2) atrapar herbívoros en una planta que no sea el cultivo, 3) bloquear el movimiento de herbívoros con vegetación alta, o 4) alterar el perfil volátil de las plantas de cultivo (Gurr *et al.*, 2017). Todos estos

³“La variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres y marinos, y otros ecosistemas acuáticos, y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas”

mecanismos promueven que los insectos que se alimentan del cultivo tiendan a abandonarlo, contrario a lo que pasa en un monocultivo donde el recurso está concentrado y en grandes cantidades. La biodiversidad también genera una regulación de las plagas del tipo “*Top-down*”. Es decir, mejora las condiciones para los enemigos naturales, aumentando la abundancia y disponibilidad de presas/huéspedes, polen, néctar, refugios y microhábitats que no se encuentran en los monocultivos o en cultivos de grandes extensiones con poca vegetación alternativa (Altieri & Nicholls, 2004).

En el trabajo de revisión de Letourneau *et al.* (2011) se comparan estudios realizados en sistemas de cultivos con alta biodiversidad con sistemas con pocas especies vegetales, y se concluye que existe un incremento del 44% en la abundancia de enemigos naturales, un 54% de aumento en la mortalidad de herbívoros y un 23 % de reducción en el daño al cultivo en los primeros sistemas con respecto a los segundos (Letourneau *et al.*, 2011).

Además de disminuir el efecto de las plagas sobre los cultivos, el aumento de la biodiversidad de plantas en el sistema acrecienta la producción del cultivo y del forraje, la producción de madera, genera estabilidad, fomenta la polinización y disminuye la aparición de malezas y enfermedades (Kremen & Miles, 2012; Isbell *et al.*, 2017). En comparación con monocultivos, los sistemas más diversificados generan mejor calidad del suelo, secuestro de carbono, capacidad de retención de agua en los suelos superficiales, así como también un uso más eficiente de la energía, y resistencia al cambio climático (Kremen & Miles, 2012).

La biodiversidad también se relaciona con los Servicios Ecosistémicos en varios niveles: como reguladora de procesos ecológicos, como un servicio ecosistémico final que actúa promoviendo la variabilidad genética y la resiliencia del ecosistema, y como un bien en sí a conservar por el valor cultural que les humanos le confieren (Mace *et al.*, 2012).

Con las bases y antecedentes de los beneficios de conservar y promover la biodiversidad dentro de sistemas productivos, se plantea como **objetivo**: evaluar la selección y preferencia de la vegetación de crecimiento espontáneo por las hormigas cortadoras de hojas, y la posibilidad de utilizar la misma en un diseño alternativo en plantaciones de sauces (*Salix* spp). La **hipótesis** es que la presencia de cierta vegetación de crecimiento espontáneo reduce el daño al cultivo causado por las hormigas, ya que actúa como fuente alternativa de corte. Con lo cual, se **predice** que en campos de sauces en donde se permite y mantiene el crecimiento de este tipo de vegetación, se observan menos ataques de hormigas cortadoras sobre el cultivo, en comparación con los campos en donde toda la vegetación es removida.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Disponibilidad de vegetación y selección por las hormigas

Se realizó un muestreo de la abundancia y riqueza de plantas en un área de aproximadamente 2 hectáreas de una plantación adulta de álamos en la Estación Experimental Delta del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Campana, Provincia de Buenos Aires (34°10'S 58°51'O). Durante un año (desde agosto del 2015 a julio del 2016) se evaluó mensualmente la riqueza de especies y la abundancia relativa tomando nueve muestras de vegetación de crecimiento espontáneo al azar. Para ello se arrojó un rectángulo de hierro de 50 x 50 cm de forma aleatoria, y toda la vegetación que se encontraba dentro del mismo fue cortada y llevada al laboratorio. Allí fue identificada, secada en un horno a 70 ° C durante 24 horas, y luego pesada (peso seco). Para evaluar la selección de las hormigas, simultáneamente al muestreo de vegetación, se identificaron tres colonias de *A. ambiguus* en la misma área. Se delimitó un perímetro de 6m alrededor de cada una de ellas, en el cual se registraron por observación directa las especies de plantas que estaban siendo cortadas *in situ* por las hormigas (Fig. 1).



Fig. 1. Hormigas cortando plantas en el sitio de muestreo.

Para evaluar si las hormigas seleccionan las especies de planta por abundancia de las mismas, se realizó un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) con un diseño de medidas repetidas. El modelo consistió en una regresión logística binaria con función de enlace *logit* y se analizó con el paquete *lme4* (Bates *et al.*, 2015) en el programa R v 3.6.1. (R Core Team, 2019). La variable de *abundancia relativa de especies* se tomó como la variable fija del modelo. Y las variables aleatorias fueron el *mes* de las mediciones, debido a las mediciones repetidas, y la *identidad de las especies* de plantas, para hacer inferencias sobre la población de la vegetación de crecimiento espontáneo. Se calcularon los pseudo R cuadrados para GLMM utilizando el paquete *MuMIn* (Bartoń, 2019).

3.2.2. Ensayos de preferencia de cafetería y duales

3.2.2.1. ENSAYOS DE ELECCIÓN MULTIPLE

Se consideraron 10 especies de las plantas que eran seleccionadas por las hormigas y se recolectaron del campo 3 ejemplares vivos de cada una. Con las hojas de estas plantas se realizaron ensayos de preferencia con diseño en cafetería, ofreciendo a las hormigas grupos de a 5 opciones separadas equidistantemente (Fig. 2). En el primer grupo se ofrecieron: *Carduus acanthoides*, *Monteiroa glomerata*, *Iris pseudacorus*, *Phytolacca americana* y *Verbena bonariensis*. Y en el segundo:



Fig. 2. Arena de forrajeo con hojas de 5 especies de hojas.

Solidago chilensis, *Ligustrum sinense*, *Fumaria capreolata*, *Lonicera japonica* y *Oxalis articulata*. Se utilizó una bandeja de plástico (33 x 46 x 12 cm) como arena de forrajeo, la cual se conectó a la colonia por medio de un puente de madera. Se permitió a las hormigas forrajear sobre las mismas durante 45 minutos y luego se retiraron los restos de hojas que quedaron. Las hojas fueron escaneadas antes y después de ser ofrecidas a las hormigas (Fig. 3), y se calculó el área cortada de cada opción (cm²), por medio del programa *ImageJ* como se explica en Guerrero Rincón *et al.* (2012). Los ensayos se realizaron con 4 colonias de *A. ambiguus*. Los resultados se analizaron con un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) tomando como variable fija el Área cortada (medida en cm²), y como variable aleatoria *Colonia*, se utilizó el paquete *lme4* (Bates *et al.*, 2015) en el programa R (R Core Team, 2019).



Fig.3. Escaneo de hojas antes (izquierda) y después (derecha) del ensayo.

3.2.2.2. ENSAYOS DUALES

Se evaluó la preferencia de las hormigas entre siete especies de plantas ofreciendo las mismas de a pares. Las especies de plantas se eligieron en función de los resultados obtenidos en el ensayo anterior, por los resultados obtenidos en el muestreo a campo, y de acuerdo con la disponibilidad de las mismas para realizar los ensayos. Se probaron las siguientes especies: *Ligustrum sinense*, *Amorpha fruticosa*,

Monteiroa glomerata, *Lonicera japonica*, *Phytolacca americana*, *Iris pseudacorus* y *Salix babylonica*. Esta última es uno de los genotipos de sauces más abundantemente producidos en la zona y es utilizado como referencia de cultivo.

El ensayo consistió en ofrecer a las hormigas hojas de tamaño similar de dos de las especies de plantas, separadas por *ca.* 30 cm. La colonia fue conectada a la arena de forrajeo (33 x 46 x 12 cm) por un puente de madera y se permitió a las hormigas coleccionar durante 45 minutos (Fig. 4). Se calculó el área cortada de cada opción, de la misma forma que el ensayo anterior. Los ensayos se hicieron con cinco colonias de *A. ambiguus*.

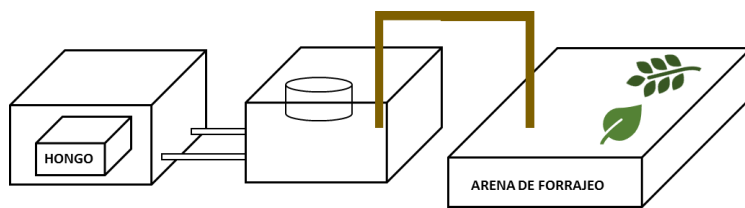


Fig. 4. Esquema de la colonia conectada a la arena de forrajeo.

Se realizaron todas las combinaciones posibles de especies de plantas y se construyeron matrices de comparación de 7 x 7 (las siete especies de plantas probadas) para cada colonia, con cada celda *ij*

representando un par de especies de plantas, y su valor, el resultado del ensayo donde la especie *i* (fila) fue preferida o no, a la especie *j* (columna). Las diferencias en el área cortada de cada opción se analizaron usando un χ^2 (valor-*p* < 0,05). En caso de diferencias significativas, el valor asignado a una celda *ij* fue 1 para la especie más cortada y 0 para la menos cortada. Para las combinaciones en las que la preferencia no era significativa (valor-*p* > 0,05), se asignó un valor de 0,5 a ambas especies de plantas, ya que esta situación se consideró un empate (De Vries, 1995). La jerarquía de cada colonia, así como también de una matriz construida con la suma de los resultados de cada colonia, se verificó mediante el índice de linealidad de Landau modificado, *h'* (Landau, 1951), porque éste considera los resultados donde hay interacciones desconocidas. El índice de Landau varía de 0 a 1, donde 1 indica linealidad completa y 0 indica que todas las especies son igualmente preferidas. Se realizó el análisis de las matrices de cada colonia para evaluar si había diferencias en las preferencias relacionadas con la identidad de las colonias. Las preferencias de las hormigas por las plantas se clasificaron por “preferencia de corte” por el Puntaje de David, un índice de clasificación de dominancia que tiene en cuenta la importancia de cada elemento en la matriz (Gammell *et al.*, 2003). Se utilizó el puntaje de David *normalizado*, porque varía entre 0 y N-1 (N es el número de especies comparadas), los valores más altos indican niveles de preferencia mayores. Los valores para cada especie de planta se compararon con un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM), tomando como variable fija el valor del puntaje de *David Normalizado* de cada especie, y como variable aleatoria *Colonia*, se utilizó el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015) en el programa R (R Core Team, 2019).

3.2.3. Ensayo a campo de plantaciones con y sin vegetación

En base a los resultados de selección y preferencia de las hormigas por la vegetación de crecimiento espontáneo, se diseñó un experimento a campo para evaluar si la presencia de estas plantas actuando como fuente alternativa de corte, reduce el ataque de hormigas cortadoras a las plantaciones de sauces.

Este ensayo se realizó en la Estación Experimental Delta del INTA, en una plantación de sauces de dos años de edad, iniciada desde guías (este es un material de plantación de 2m de longitud), en la cual no

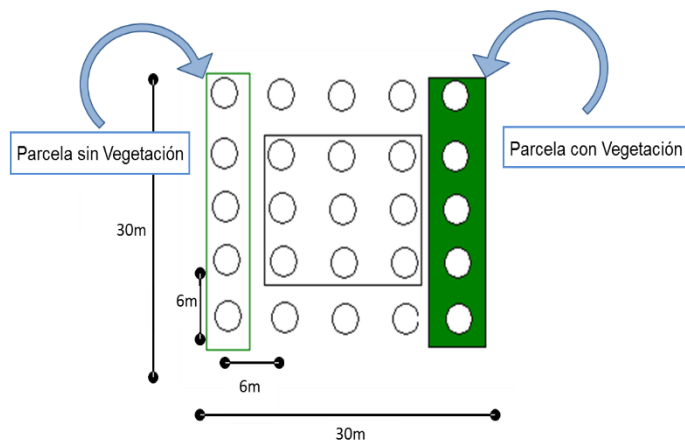


Fig. 5. Esquema del diseño de la parcela

se controlaba químicamente a las hormigas. Se eligieron parcelas del clon G (94.08.43) ya que suele ser atacado por hormigas cortadoras. Cada unidad experimental poseía 25 árboles, plantados en un diseño de 5 x 5, distanciados por 6 metros (Fig. 5). Se tomaron las dos hileras externas de cada parcela, en una se permitió y mantuvo el crecimiento de la

vegetación espontánea (*"Parcela con vegetación"*), y en la otra se removió mecánicamente la vegetación a una distancia de un metro a cada lado de las guías (*"Parcela sin vegetación"*).

Se midió observacionalmente el porcentaje de foliación de cada planta una vez por semana durante dos meses, entre noviembre del 2016 y enero del 2017. Se tomaron datos de 4 unidades experimentales, las mismas estaban separadas entre 50 y 100 metros de distancia entre sí. Los resultados se analizaron con un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) utilizando el paquete nlme (Pinheiro *et al.*, 2019) en el programa R (R Core Team, 2019), tomando como variables fijas el *Tratamiento* (con o sin vegetación) y el *Tiempo* (semanas 1-8), y como variables aleatorias *Bloque* (cada unidad experimental) e *Individuo* (cada guía). Al ser un diseño de Medidas Repetidas, la matriz de covarianza se modeló como Autoregresiva de primer orden (ya que es la que mejor explicaba los datos), y se modeló la varianza con la función *varIdent*.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Disponibilidad de vegetación y selección por las hormigas

A lo largo del año de muestreo, se registraron 39 especies de plantas en el área estudiada. La vegetación disponible para *A. ambiguus* fue variada, especialmente de octubre a marzo, que corresponde a las estaciones de primavera y verano (hasta 18 especies) (Fig.6).

De las 39 especies de plantas registradas, las hormigas cortaron 19 de ellas (puntos negros, Fig.6). Este análisis determinó que la selección de corte de las hormigas no está relacionada con la abundancia (valor-p = 0,85). Para lograr una mejor comprensión de la selección de las hormigas, la proporción de varianza explicada por el modelo GLMM se midió como R^2_{GLMM} condicional y marginal. El análisis evidenció una mayor proporción de varianza explicada por variables aleatorias que por la variable fija *abundancia relativa* ($R^2_{GLMM}(c) = 75,9\%$, $R^2_{GLMM}(m) = 0,036\%$ respectivamente). Para determinar cuánta variabilidad explicaba cada variable aleatoria, se compararon las varianzas estimadas. Los resultados mostraron que la varianza de la *identidad de especies* fue mayor que la contabilizada por *mes* (9,78; 0,87; ambos en la escala de enlace, respectivamente). Esto sugiere que la *identidad de especies* puede ser el principal efecto que explica la variabilidad en la selección de las hormigas. *Lonicera japonica* e *Iris pseudacorus*, por ejemplo, fueron cortadas por *A. ambiguus* durante todo el año, incluso cuando su abundancia fue baja (por ejemplo, en mayo). *Sonchus oleraceus*, *Amorpha fruticosa* y *Ligustrum sinense* no fueron abundantes durante el muestreo, pero cada vez que estuvieron presentes fueron

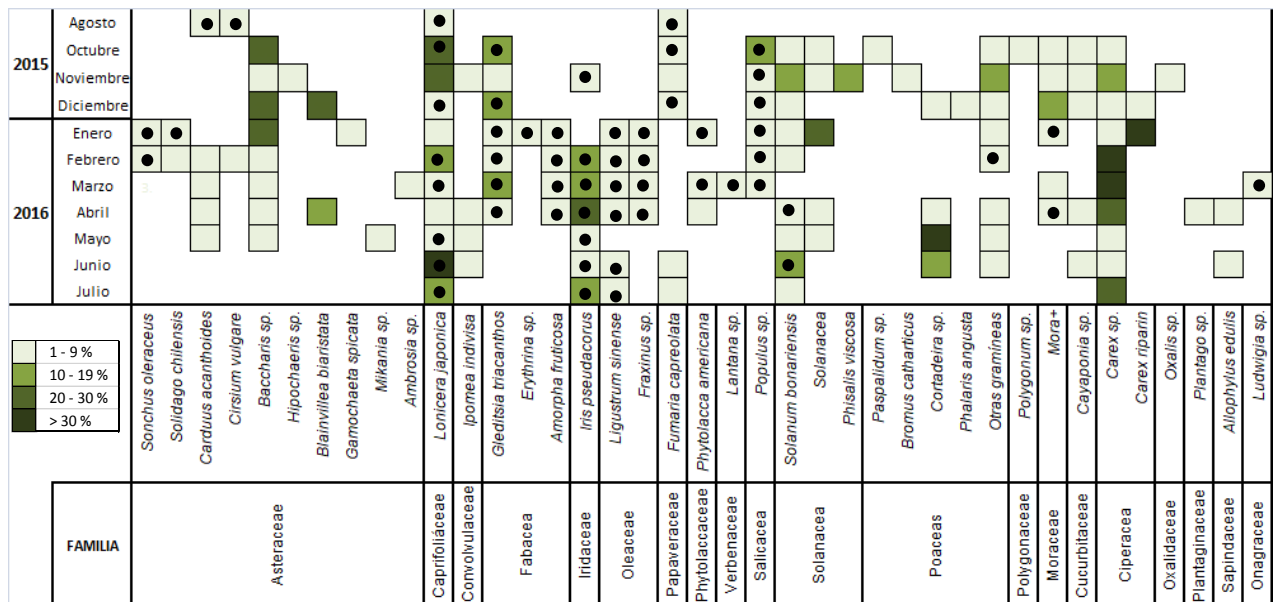


Fig.6. Familias y especies de plantas muestreadas durante un año. La intensidad del color verde indica la abundancia mensual de cada plantas (% de peso seco). Los puntos negros indican la actividad de corte de las hormigas en cada mes.

cortadas. Las especies leñosas *Populus spp.*, *Gleditsia triacanthos* y *Fraxinus spp.* también fueron seleccionadas por las hormigas cuando estuvieron presentes.

3.3.2. Ensayos de preferencia de cafetería y duales

3.3.2.1. ENSAYOS DE ELECCIÓN MÚLTIPLE

En los gráficos siguientes se observan los resultados obtenidos en ambos ensayos (Fig.7):

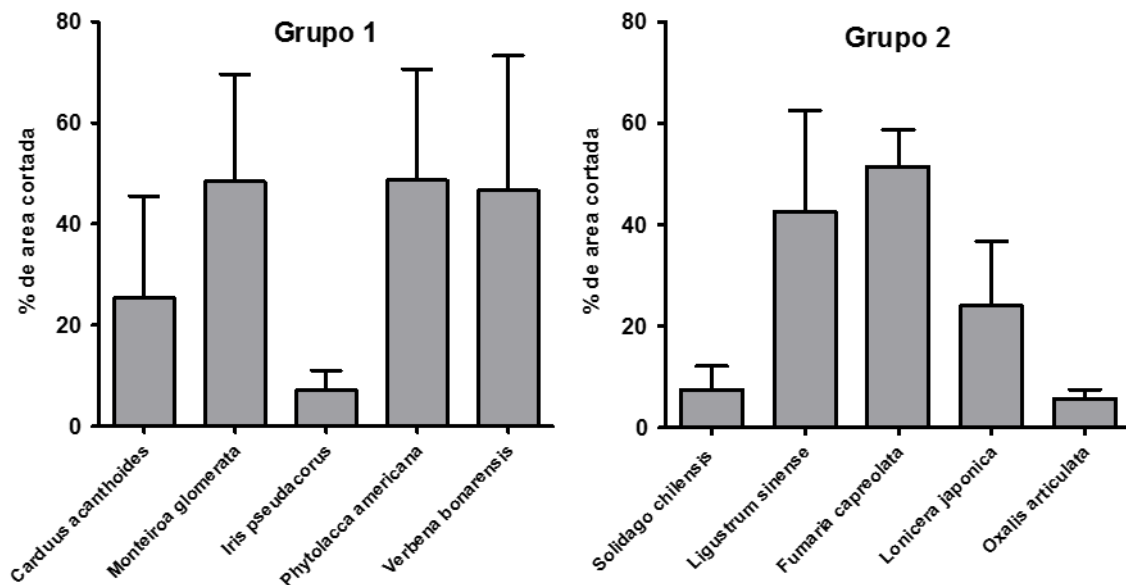


Fig.7. Ensayos de cafetería, 10 especies de plantas ofrecidas en dos grupos de 5. Media y error estándar (N=4). Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas para preferencia de corte entre especies vegetales (valor-p > 0,05). Sin embargo, puede verse en los gráficos que hay ciertas especies que tendieron a ser más cortadas que otras. En el primer grupo *M. glomerata*, *P. americana* y *V. bonariensis* fueron las más cortadas, y en el segundo grupo *L. sinense* y *F. capreolata*. En la siguiente sección se presentan los resultados de comportamiento de corte de las hormigas frente a estas especies vegetales, en comparación con el cultivo a proteger (*i.e.*, sauce).

3.3.2.2. ENSAYOS DUALES

Se calculó el Índice de linealidad de Landau para cada colonia y luego se realizó una matriz con los resultados de todos los ensayos. El valor del índice de linealidad de Landau para cada colonia no fue significativo (valor-p > 0,1), excepto para la colonia 2 (valor-p = 0,03). Los resultados de la sumatoria de las cinco colonias ($h' = 0,62$, $P = 0,11$) indican que las preferencias entre las opciones no son lineales, es decir, no existe una organización jerárquica entre las especies de plantas seleccionadas por las hormigas, al menos en este ensayo. (Fig. 8).

Colonia 1

	Ls	A	S	M	Lj	P	I
Ls		0.5	1	0	0.5	0	1
A	0.5		0	1	0.5	1	1
S	0	1		0	1	1	1
M	1	0	1		1	1	1
Lj	0.5	0.5	0	0		0.5	1
P	1	0	0	0	0.5		1
I	0	0	0	0	0	0	

h' = 0,55
p = 0,19

Colonia 4

	Ls	A	S	M	Lj	P	I
Ls		0	0	1	0.5	1	0
A	0		0	1	1	1	0
S	0	0		0	0	0	0
M	0	0	0		0	0.5	0
Lj	0.5	0	0	0		0	0
P	0	0	0	0.5	0		0
I	0	0	0	0	0	0	

h' = 0,44
p = 0,4

Colonia 2

	Ls	A	S	M	Lj	P	I
Ls		1	1	0	1	1	1
A	0		0	1	1	1	1
S	0	1		0.5	1	1	1
M	1	0	0.5		0.5	1	1
Lj	0	0	0	0.5		1	1
P	0	0	0	0	0		0
I	0	0	0	0	0	1	

h' = 0,76
p = 0,03

Colonia 5

	Ls	A	S	M	Lj	P	I
Ls		0	1	1	1	1	1
A	0		0	0.5	1	1	0.5
S	0	1		1	1	0.5	1
M	0	0.5	0		0	0	0
Lj	0	0	0	1		1	1
P	0	0	0.5	1	0		0
I	0	0.5	0	0	0	0	

h' = 0,62
p = 0,14

Colonia 3

	Ls	A	S	M	Lj	P	I
Ls		1	1	0	1	1	1
A	0		0	0.5	1	0.5	1
S	0	1		0	1	0.5	1
M	1	0.5	1		0	1	1
Lj	0	0	0	1		0.5	0.5
P	0	0.5	0.5	0	0.5		1
I	0	0	0	0	0.5	0	

h' = 0,5
p = 0,28

Matriz de 5 colonias juntas

	Ls	A	S	M	Lj	P	I
Ls		2.5	4	2	4	4	4
A	1.5		0	4	4.5	4.5	3.5
S	0	4		1.5	4	3	4
M	3	1	2.5		1.5	2.5	4
Lj	1	0.5	0	2.5		3	3
P	1	0.5	1	2.5	1		3
I	0	0.5	0	0	1	1	

h' = 0,62
p = 0,11

Fig. 8. Las celdas con valores 1 indican que las especies de esa fila fueron preferidas a las especies de las columnas. Los valores 0, que no fueron preferidas, y 0,5 que no hubo preferencia por ninguna de las dos especies. A la derecha de cada matriz se indica los valores del Índice de Landau (h') y su valor-p. Ls: *Ligutrum sinense*; A: *Amorpha fruticosa*; S: *Salix babylonica*; M: *Monteiora glomerata*; Lj: *Lonicera japonica*; P: *Phytolacca americana*; I: *Iris pseudacorus*.

Se calculó el Puntaje de David normalizado para presentar un análisis cuantitativo de la preferencia de cada planta en los ensayos duales (Fig. 9), y los resultados demuestran que *S. babylonica*, la planta de referencia, se ubicó entre las otras especies de plantas de la vegetación de crecimiento espontáneo seleccionadas por las hormigas en el campo. En este análisis se puede observar que algunas especies de plantas parecen ser más preferidas que otras (valor-p <0,001), por ej. *L. sinense* parece ser más preferida que *P. americana* e *I. pseudacorus*. Pero como la preferencia no es lineal, no se puede afirmar esta jerarquía.

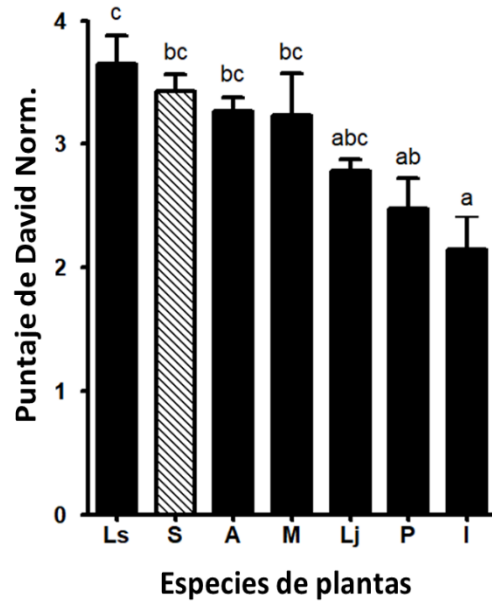


Fig. 9. Análisis de Tukey sobre los resultados del Puntaje de David Normalizado, las diferentes letras indican significancia estadística de 0,05. Media y error estándar (N=5). Especies de plantas: Ls: *Ligutrum sinense*; S: *Salix babylonica*, A: *Amorpha fruticosa*; M: *Monteiroa glomerata*; Lj: *Ligutrum sinense*; P: *Phytolacca americana*; I: *Iris pseudacorus*.

3.3.3. Ensayo a campo de plantaciones con y sin vegetación

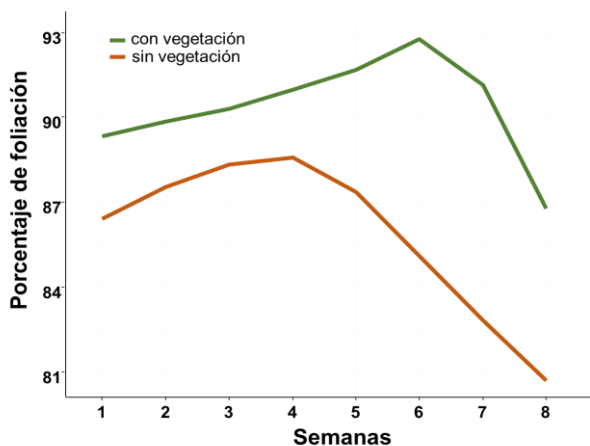


Fig. 10. Cantidad de follaje remanente a lo largo de dos meses, en los tratamientos con y sin vegetación.

El resultado del análisis de Medidas Repetidas indicó que existe una interacción entre las variables *Tratamiento* (Parcelas con y sin vegetación) y *Tiempo* (valor-p= 0,0189). Un análisis *a posteriori* mostró que la diferencia se evidenció marcadamente a partir de la 5^{ta} semana del inicio del ensayo (valor-p<0,05; prueba de Tukey) (Fig. 10).

3.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El Delta del Paraná es un humedal, y como tal, posee una gran diversidad de plantas, esto se evidenció en el muestreo anual realizado. Si bien el sitio donde fue realizado es una zona productiva que fue altamente modificada, y gran parte de la vegetación que se encuentra en este lugar es exótica, se pudo observar que las hormigas cortadoras de hojas realizan una selección dentro de las opciones de corte disponibles a lo largo del año. Los resultados de los ensayos de preferencia realizados con especies de plantas seleccionadas por las hormigas indican que no tienen una preferencia de corte por el sauce por sobre las otras especies vegetales, ni tampoco existe una jerarquía entre las especies evaluadas. Esto era una posibilidad, ya que las hormigas son básicamente generalistas (Cherrett, 1972), y el experimento de preferencia en laboratorio fue diseñado con plantas que son seleccionadas a campo. Al no existir una alta preferencia de las hormigas por el sauce, se puede afirmar que la vegetación de crecimiento espontáneo que es seleccionada, puede actuar como una alternativa de corte si se conserva y mantiene en el campo. De esta forma se podría generar un manejo del hábitat que disminuya el daño producido en el cultivo por las hormigas y, además, que maximice las oportunidades del control por enemigos naturales y genere servicios ecosistémicos (Landis *et al.*, 2000).

Entre las plantas seleccionadas por las hormigas se encuentran algunas que podrían producir disservicios ecosistémicos⁴, entre ellas *Gleditsia triacanthos* (“Acacia negra”) e *Iris pseudacorus* (“Lirio amarillo”). Ambas especies, si bien son altamente seleccionadas por las hormigas (la acacia fue cortada 6 de los 7 meses en los que se registró en el muestreo, y el lirio fue cortado en los 7 meses en los cuales fue registrado), son plantas exóticas muy invasoras. Y, en el caso de la acacia, esta es, además, un árbol leñoso con espinas peligrosas para el ganado, que compite con los restos de bosques nativos que quedan en la zona. Por el contrario, otras especies poseen características muy útiles si se piensa no sólo en el aumento de la biodiversidad para disminuir el daño por plagas, sino también en diversificar la producción. *Verbena bonariensis*, *Ligustrum sinense*, *Amorpha fruticosa*, *Lonicera japonica*, *Sonchus oleraceus*, *Iris pseudacorus*, *Solidago chilensis* y *Carduus acanthoides* poseen valor apícola (Dra. Laura Gurini, comunicación personal). *A. fruticosa* además posee valor forrajero para el ganado, junto con *Phytolacca americana*, *Paspalum* sp. (Ms. Ing. Edgardo Casaubón, comunicación personal), y otras especies registradas en el muestreo anual. Estas características podrían aprovecharse para generar, por ejemplo, un sistema silvoapícolapastoril⁵.

⁴ “Los disservicios ecosistémicos son las funciones, procesos y atributos generados por el ecosistema que resultan en impactos negativos percibidos o reales sobre el bienestar humano” (Shackleton *et al.*, 2016).

⁵ Producción forestal, ganadera y apícola en el mismo campo.

También hay que tener en cuenta que cuando se habla de biodiversidad no se está sólo hablando de número de especies, sino también del rol ecológico que cada una de ellas cumple en el ecosistema (diversidad funcional), y que ese rol puede ser desempeñado por más de una especie en el momento en que se está realizando el estudio (como la polinización o el valor forrajero), o una misma especie puede cumplir más de una función. Si bien esto podría parecer redundante, cuando las condiciones cambian (como está sucediendo con el cambio climático por ejemplo), se necesita de esa diversidad funcional para mantener las condiciones ambientales del lugar (Isbell *et al.*, 2011; Gurr *et al.*, 2017). En el ensayo a campo, en donde no se realizó ningún tipo de manejo, sino que solo se dejó crecer la vegetación espontánea, la biodiversidad fue efectiva en el control del daño producido por las hormigas cortadoras. Si se parte de estos resultados, y se genera un diseño de plantación forestal realizando un manejo del hábitat que genere o refuerce la complejidad del paisaje con mayor biodiversidad, controlando la vegetación que puede generar disservicios, se podría reducir el riesgo de que las hormigas cortadoras de hojas se conviertan en plaga.



CAPÍTULO 4:



ESTÍMULO PULL –NARANJA COMO ATRAYENTE

4.1. INTRODUCCIÓN

Entre los metabolitos secundarios, que actúan como infoquímicos (en el primer capítulo mencionamos a las *alomonas* que cumplen función repelente), existen sustancias que cumplen función atrayente, las *kairomonas* (Schoonhoven *et al.*, 2005), y que se utilizan ampliamente en el manejo integrado de plagas. La atracción de los insectos fitófagos a infoquímicos producidos por sus plantas hospedadoras ha sido estudiada para muchos sistemas, incluso también la atracción de predadores y parasitoides a los volátiles de plantas dañadas por herbivoría (Guerin & Städler, 1982; Visser, 1986; Bernays & Chapman, 1994; Schoonhoven *et al.*, 1998; Obeysekara *et al.*, 2014).

Entre los compuestos atrayentes derivados de plantas, la pulpa de naranja, *Citrus sinensis* L. Osbeck (Rutaceae), es uno de los sustratos más conocidos para las hormigas cortadoras de hojas (Mudd *et al.*, 1978; Verza *et al.*, 2006) y se utiliza como base para cebos insecticidas (Verza *et al.*, 2011). Esta porción de la fruta parece ser la más adecuada como sustrato para el hongo simbionte debido a su leve acidez, su contenido de carbohidratos y nitrógeno, y a la presencia de una gran variedad de vitaminas y microelementos (Mudd *et al.*, 1978). La atracción hacia la pulpa de naranja fue evaluada en muchas especies de hormigas cortadoras: los resultados fueron positivos para *Atta cephalotes* (Littledyke & Cherrett, 1978; Mudd *et al.*, 1978), y *Atta sexdens rubropilosa* (Carlos *et al.*, 2010; Verza *et al.*, 2006, 2011). Para *Acromyrmex octopinosus* la fruta entera generaba atracción (Littledyke & Cherrett, 1978; Mudd *et al.*, 1978). En Almeida *et al.* (2013) *Acromyrmex niger* y *Acromyrmex disciger* fueron atraídas a un ensayo de campo con cáscaras de naranja. En el trabajo de Cafarinni *et al.* (2006) hallaron que en *Acromyrmex lundii* la atracción era más fuerte por extractos de otros cítricos como mandarina (*Citrus deliciosa*) o pomelo (*Citrus paradisi* var. *Duncan*). Lima *et al.* (2003) reportaron que los cebos a base de pulpa de naranja como atrayente no fueron colectados por *Atta bisphaerica* y evaluaron posibles atrayentes naturales para esta especie a base de pasto jaraguá (*Hyparrhenia rufa*) y hojas de caña de azúcar, con ambos obtuvieron muy buenos resultados.

Curiosamente, los cítricos poseen *d-limoneno*, un probado repelente de algunas hormigas cortadoras de hojas y de las “hormigas de fuego” *Solenopsis* spp. (Verza *et al.*, 2011). Littledyke y Cherrett (1978) mostraron que las hormigas de las especies *Atta cephalotes* y *Acromyrmex octopinosus* no recolectaban cáscara de naranja fresca, aunque sí naranjas enteras y pulpa seca. Esto parece ser consecuencia de que, justamente en la cáscara se encuentra ese compuesto en mayor concentración,

ya que forma parte de los sacos de aceite. En los ensayos realizados por Verza *et al.* (2011), con esas mismas especies de hormigas cortadoras, se evaluó cuánto influía la presencia de diferentes concentraciones de *d-limoneno* en la atracción generada por la pulpa de naranja, los resultados indicaron que, a una concentración de 100 ppm de *d-limoneno* en pulpa de naranja, las hormigas colectaban igual que con la pulpa sola.

Las diferentes especies de hormigas cortadoras pueden responder de manera distinta a los atrayentes, por eso se plantea como **objetivo** evaluar la atracción de tres especies de *Acromyrmex* spp. (*A. ambiguus*, *A. lundii* y *A. lobicornis*) a la naranja, *Citrus sinensis* L. (Rutaceae), evaluar qué parte de la fruta es la que produce mayor atracción, y si los volátiles emitidos por la misma son capaces de orientar a las hormigas hacia una fuente de alimento. La **hipótesis** es que la pulpa de naranja, y los volátiles emitidos por ésta, actúa como atrayentes para todas las especies de *Acromyrmex* spp. evaluadas. Con lo cual, se **predice** que las hormigas son atraídas por los volátiles emitidos por la fruta, y que la presencia de estos compuestos modifica el comportamiento de las mismas orientándolas a una potencial fuente de alimento que será alternativa al cultivo que se desea proteger.

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Atracción por diferentes partes de la naranja

Para determinar qué parte de la naranja *Citrus sinensis* L. (Rutaceae) es la más atractiva para las hormigas cortadoras de hojas se realizaron ensayos de preferencia utilizando subcolonias de la especie *A. ambiguus*. Se ofrecieron a las hormigas tres opciones diferentes de una porción cuadrada de



Fig. 1. Subcolonia con las 3 opciones de naranja

material de 2 cm x 2 cm para elegir. Las opciones fueron: *pulpa*, *cáscara* y una combinación de *pulpa + cáscara* (mitad pulpa y mitad cáscara). Las opciones se colocaron a 5 cm una de la otra, y se ubicó verticalmente entre ellas una porción de papel de aluminio a modo de separación (Fig. 1.). Se permitió que las hormigas entraran a la arena y se registró el número de hormigas en contacto con cada opción cada 2 minutos durante una hora, se sumó el total de hormigas en cada opción para cada

ensayo. El ensayo se realizó con 18 subcolonias provenientes de tres colonias, y los resultados se analizaron con un Modelo Lineal Mixto Generalizado (GLMM) con distribución de Poisson utilizando el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015) en el programa R (R Core Team, 2019), tomando *colonia* y *subcolonia* como variables aleatorias anidadas, y se realizó una prueba *a posteriori* de Tukey.

4.2.2. Atracción por volátiles de diferentes partes de la naranja

Para evaluar si las hormigas (*A. ambiguus*) utilizan los volátiles de la naranja como claves para su elección en lugar de claves químicas de contacto, se realizó un ensayo con las mismas porciones que en el ensayo anterior, pero utilizando unas jaulas que excluyeron a las hormigas y evitaron el contacto con las opciones (iguales a las que se utilizaron en el ensayo con farnesol en el capítulo 2) (Fig. 2). Se colocaron las tres porciones distintas (*pulpa*, *cáscara*, y *pulpa + cáscara*) de 1 cm x 1 cm dentro de las jaulas, de esta forma las hormigas podían elegir por el olor (volátiles), pero no por claves químicas de contacto como, por ejemplo, los azúcares de la fruta. Al igual que en el ensayo anterior, el número de hormigas sobre cada jaula se registró cada 2 minutos durante una hora, y se sumó el total de hormigas en cada opción para cada ensayo. El ensayo se realizó con 18 subcolonias provenientes de tres colonias, y los resultados se analizaron con un Modelo Lineal Mixto Generalizado (GLMM) con distribución de Poisson utilizando el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015) en el programa R (R Core Team, 2019), tomando *colonia* y *subcolonia* como variables aleatorias anidadas, y se realizó una prueba *a posteriori* de Tukey.



Fig. 2. Diferentes porciones de naranja dentro de jaulas de exclusión.

4.2.3. Colecta e identificación de compuestos volátiles

Se decidió comparar la composición de volátiles de las dos porciones de la naranja: cáscara y pulpa, para evaluar si las diferencias en sus perfiles químicos justificaban el comportamiento de las hormigas. Para la colecta de volátiles, la fruta fue colectada de árboles del campo de fruticultura de la Facultad de Agronomía de la UBA (gracias a la colaboración de la Dra. Miriam Izaguirre de la cátedra de Fruticultura de la FAUBA), la misma fue pelada y la pulpa cortada en porciones pequeñas. La cáscara y la pulpa (60 gramos aproximadamente de cada porción) se colocaron por separado en cámaras de vidrio cilíndricas de ca. 0,8 L



Fig. 3. Cámaras de vidrio con las diferentes porciones de naranja para la colecta de volátiles.

(40 cm de largo, 5 cm de diámetro). La recolección se realizó de la siguiente manera: una corriente de aire con un flujo de 1500 ml/min se pasó por un filtro de carbón activado para purificarla, y luego se la dirigió hacia las cámaras de vidrio donde estaban colocadas las partes de la fruta (Fig. 3). Previo a este

procedimiento, se hizo pasar el aire por las mismas cámaras, pero vacías, para realizar los blancos de cada una de ellas. El tiempo de recolección fue de una hora y media. Los volátiles se recogieron en trampas de 30 mg de adsorbente Hayesept Q (Grace, Deerfield, IL, EE. UU.). Luego de la recolección, los compuestos volátiles atrapados fueron eluidos con 150 μ l de diclorometano, y se analizaron químicamente usando un Cromatógrafo de Gases Agilent 7890 acoplado al detector de masas selectivo Agilent 5977, equipado con una columna HP-5 (30 m \pm 0,32 mm de diámetro interno \pm 0,25 μ m de espesor de película; Agilent Technologies) y un detector de ionización de llama. La temperatura inicial del horno fue de 60 °C, después de 1 minuto la temperatura del horno se incrementó a 150 °C a una tasa de 2 °C por minuto, y de 150 °C a 230 °C a 20 °C por minuto. Las muestras se inyectaron en el modo “*splitless*” con el inyector purgado a 30 segundos, utilizando nitrógeno a una velocidad de flujo de 27,6 cm/seg como gas portador.

4.2.4. Ensayos de comportamiento con compuestos volátiles

4.2.4.1. PREFERENCIA CON PULPA DE NARANJA

Se evaluó la atracción de la pulpa exclusivamente por sus compuestos volátiles analizando la respuesta de las hormigas (*A. ambiguus*) a dos concentraciones de pulpa: *entera* y *diluida* (0,15 gr en 1 ml de agua destilada).

El dispositivo consistió en una caja de acrílico, con pequeñas perforaciones en la base, la cual dividía dos fuentes de olor que provenían de dos recipientes encastrados en la parte inferior de la caja (Fig. 4). Una mitad recibió olor a pulpa de naranja (*entera* o *diluida*) y la otra solo a agua destilada (control). El dispositivo se cerró con una tapa de vidrio en cuanto empezó el ensayo comportamental. El mismo se inició con el traslado cuidadoso de grupos de 3 hormigas a la caja⁶,

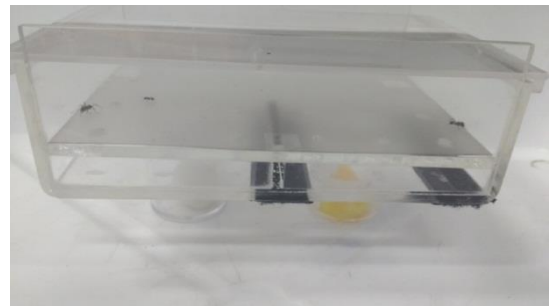


Fig.4. Dispositivo de preferencia por volátiles

se esperó 1 minuto de adaptación, y luego se registró el número de hormigas presentes en cada opción, cada 10 segundos durante 5 minutos. Se realizaron 15 repeticiones con grupos de tres hormigas provenientes de la misma colonia. Se tomó como dato el número de hormigas presentes en la mitad del dispositivo al que llegaban los volátiles de la pulpa de naranja, durante esos 5 minutos. Estos datos se compararon con resultados teóricos de distribución al azar de las hormigas entre las dos opciones, con un análisis de Chi². Luego se realizó un Prueba de T de student, comparando los

⁶ Previamente se realizaron ensayos con una sola hormiga, pero sola no llegaba a adaptarse al espacio, con lo cual no respondía correctamente.

resultados de los ensayos con la pulpa *entera* y *diluida*, para evaluar si en efecto de la concentración influía en la atracción.

4.2.4.2. ORIENTACIÓN CON PULPA DE NARANJA

Se evaluó si las hormigas de la especie *A. ambiguus*, además de percibir los volátiles de pulpa se pueden orientar hacia ellos. Para esto se utilizó un segundo dispositivo que funcionó como un olfatómetro con flujo de aire (800 ml/min). El dispositivo consistió en una plataforma conectada con tres tubos: uno en donde eran trasladadas las hormigas y por donde se bombeaba el flujo de aire hacia afuera; y otros

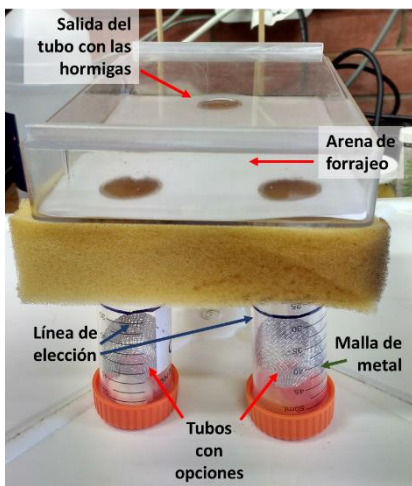


Fig. 5. Olfatómetro con flujo de aire

dos en donde se ubicaban los estímulos (pulpa de naranja y control) debajo de una malla de metal, dispuestos uno al lado del otro, y con pequeñas perforaciones cerca de la base, por donde el aire entraba al sistema. La plataforma superior donde estos tres tubos desembocaban actuó de arena de forrajeo, que se cerró con una tapa de vidrio (Fig. 5). Se trasladaron cuidadosamente 3 hormigas al tubo, éste se conectó al olfatómetro y se succionó el aire para que llegara el olor desde los tubos con los estímulos. El ensayo inició cuando al menos 2 de las hormigas subieron a la arena de forrajeo, y se registró la elección una vez que las hormigas cruzaron una línea de elección

marcada sobre los tubos con las opciones. En estos ensayos se evaluaron 2 concentraciones de pulpa: *entera* y *diluida* (0,15 gr en 1 ml de agua destilada), y se hicieron 30 réplicas de grupos de 3 hormigas provenientes de la misma colonia. Luego se probó una tercera concentración en donde se impregnaron discos de papel de filtro (0,5 cm de diámetro) solo con los *volátiles* de la pulpa de la siguiente manera: los discos se ubicaron dentro de una caja de Petri cerrada durante 24 hs con pulpa de naranja, sin que entraran en contacto con la misma. Lo mismo se realizó con agua destilada para los discos control (Fig. 6). Se utilizaron 10 discos de cada opción por ensayo, y se realizaron 13 réplicas. También se realizaron pruebas con las dos primeras concentraciones de pulpa (*entera* y *diluida*) agregándoles hojas verdes (de la especie que estaba siendo utilizada para alimentar a las hormigas diariamente) debajo de la malla metálica en los tubos donde estaban las opciones. Esto se realizó con el objetivo de evaluar si el olor del entorno ("*background*") modulaba el comportamiento de orientación (Schröder & Hilker, 2008). Se realizaron 30 réplicas con cada concentración.

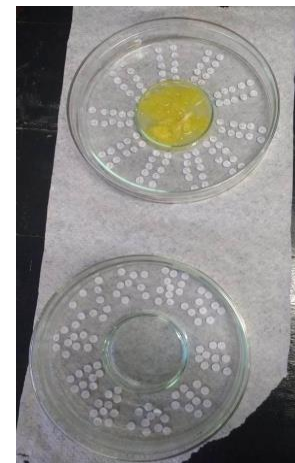


Fig. 6. Impregnación de discos de papel con volátiles

Todos los ensayos duraron como máximo 10 minutos y se registró la primera elección de alguna de las hormigas. Los resultados se analizaron con una Prueba de χ^2 .

4.2.4.3. OLFATÓMETRO DE AMBIENTE ESTACIONARIO CON ACEITE ESENCIAL DE NARANJA

Para evaluar la preferencia de las hormigas por el olor a naranja proveniente de un aceite esencial (proporcionado generosamente de una extracción realizada por el Dr. Hugo Chludil, Biomoléculas, FAUBA), se utilizó un dispositivo tomado de Saverschek & Roces (2011) que actuó como un olfatómetro de ambiente estacionario, en el cual la manipulación de las hormigas fue mínima antes de la elección. Se utilizaron colonias de la especie *A. ambiguus*. Cada colonia fue conectada a una arena de forrajeo por medio de un puente de madera, y se le ofreció el material vegetal para cortar, con el que se las



Fig. 7. Olfatómetro de ambiente estacionario, tomado de Saverschaek & Roces (2011).

alimentaba diariamente. Una vez establecido el camino de forrajeo sobre el puente, se desviaba a una hormiga de éste, por medio de un segundo puente alternativo hasta una plataforma en donde se le ofrecían dos opciones de olores: un disco de papel de filtro tratado con 3 μ l aceite esencial de naranja al 1% (en diclorometano), y un disco control (3 μ l diclorometano). Ambas opciones se encontraban en la parte superior del dispositivo de elección, fuera de alcance de la hormiga, y ésta debía escoger entre dos palillos que la llevaban hacia la fuente del olor. Se registró la decisión de cada hormiga cuando ésta caminó sobre alguno de los dos palillos. Estos fueron

renovados para cada individuo luego de cada medición, y todo el dispositivo fue cambiado luego de 5 repeticiones, o antes, si alguna hormiga llegaba a entrar en contacto con el mismo, para evitar que quedaran marcas químicas.

El ensayo se realizó con 90 hormigas de 3 colonias diferentes (30 hormigas por colonia, $N=90$) y los resultados obtenidos se analizaron con una Prueba de χ^2 .

4.2.5. Atracción por naranja en el campo

4.2.5.1. ATRACCIÓN POR PULPA DE NARANJA

El ensayo se realizó en diciembre del 2017 en Dina Huapi, Río Negro (41 ° 04'S y 71 ° 09'O) en un ambiente estepario con vegetación herbácea/arbustiva, y se trabajó con la especie *Acromyrmex lobicornis*.

Se localizaron y utilizaron 10 colonias, y de cada una de ellas se tomaron dos caminos de forrajeo. En cada uno de los caminos se llevó a cabo un experimento de preferencia pareada: se ubicaron dos discos

de papel de filtro (8 cm de diámetro) en lados opuestos del mismo, uno de los discos se trató con 2 ml de pulpa de naranja y el otro con agua como control (Fig. 8). Diez minutos después de colocar los discos de papel de filtro, se registró el número de hormigas en contacto con cada disco, se realizaron 6 registros por ensayo durante una hora y media aproximadamente, y los mismos se sumaron. Los resultados de número de hormigas sobre cada disco se analizaron con un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) con distribución de Poisson utilizando el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015) en el programa R (R Core Team, 2019), tomando *colonia* y *camino* como variables aleatorias anidadas.



Fig.8. Discos de papel *tratado* y *control* a ambos lados de un camino de forrajeo

4.2.5.2. ATRACCIÓN POR ACEITE ESENCIAL DE NARANJA

Este ensayo se realizó en el mismo sitio que el anterior (4.2.5.1), y con la misma especie de hormiga cortadora. Primero se evaluaron tres concentraciones en simultáneo del aceite esencial de naranja (1%, 0,1% y 0,01%), más un control sólo con el solvente (acetona), con el objetivo de ver el



Fig. 9. Evaluación de distintas concentraciones de aceite de naranja.

comportamiento de las hormigas hacia esas concentraciones. Se utilizaron 3 colonias, y se ubicaron 4 discos de papel de filtro (8 cm de diámetro) impregnados cada uno con 300 μ l de cada concentración, y uno con ese mismo volumen de acetona. Todos los discos fueron ubicados de un mismo lado del camino de forrajeo y separados por aproximadamente 50 cm (Fig. 9). Una vez ubicados los discos, se

esperó 10 minutos y se registró el número de hormigas que entraban en contacto durante un minuto, se realizaron 3 observaciones por cada disco, separadas por 15 minutos aproximadamente y las mismas se sumaron. Los resultados de número de hormigas sobre cada disco se analizaron con un Modelo Lineal Mixto Generalizado (GLMM) con distribución de Poisson utilizando el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015) en el programa R (R Core Team, 2019), tomando *colonia* como variable aleatoria. Luego se realizaron experimentos de preferencia pareada en 6 colonias: en cada camino se ubicaron discos de papel de filtro de lados opuestos, uno tratado con una concentración de aceite esencial de naranja, y el otro sólo con el solvente como control. Por cada colonia se tomaron 3 caminos de forrajeo y se evaluaron las tres concentraciones por separado, con su respectivo control. Nuevamente, una vez

ubicados los discos, se esperó 10 minutos y se registró el número de hormigas que entraban en contacto durante un minuto, se realizaron 3 observaciones por cada disco, separadas por 15 minutos aproximadamente y las mismas se sumaron. Los resultados de número de hormigas sobre cada disco se analizaron con un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) con distribución de Poisson utilizando el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015) en el programa R (R Core Team, 2019), tomando *colonia* como variable aleatoria.

4.2.6. Aceite de naranja como refuerzo de atracción en vegetación palatable

El ensayo se realizó en un estaquero de sauces ubicado en un espacio al aire libre en la Cátedra de Biomoléculas de la Facultad de Agronomía de la UBA. Este sitio cuenta con la presencia de dos colonias de la especie *A. lundii*. El estaquero presentaba todos sus sauces protegidos con barreras mecánicas comerciales (consisten en una goma espuma cubierta con un plástico que se ubica alrededor del tallo del árbol), y en el entorno del mismo se plantaron dos ejemplares de 5 especies de plantas, 4 de ellas especies seleccionadas por las hormigas a

campo: *Ligustrum sinense* (“ligustrina”), *Amorpha fruticosa* (“sauce indio”), *Iris pseudacorus* (“lirio”) y *Lonicera japonica* (“madreselva”) (ver. Cap.3); y una especie, *Verbena bonariensis* (“verbena”), que es una planta nativa que las hormigas cortan en el campo (Lic. Ayelén Nally, comunicación personal). A estas plantas se les adjuntó un dispositivo que consistió en un hilo de algodón de 20 cm. de longitud, el cual se ató en el extremo de un palillo de metal que fue clavado en el suelo, al lado de cada planta. De

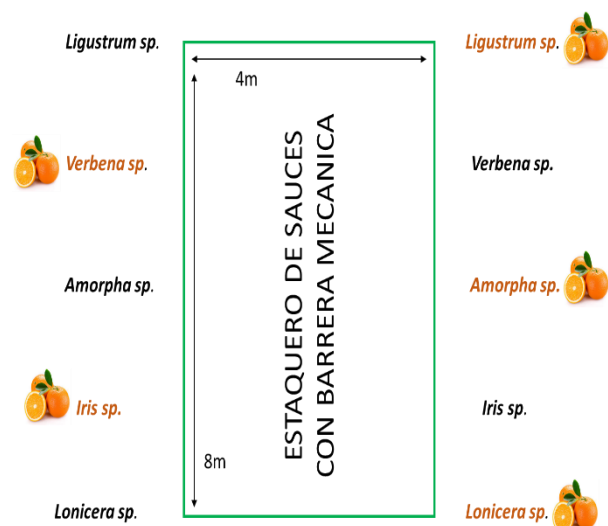


Fig. 10. Esquema de la disposición de las plantas alrededor del estaquero. Las plantas que tienen las naranjas al lado son las *tratadas*, y su par de color negro *control*.

cada especie de planta se utilizaron dos ejemplares, a uno se le agregó el dispositivo con 300 µl de aceite esencial de naranja al 1% (se utilizó acetona como solvente) embebido en el hilo de algodón, *planta tratada*, y al otro 300 µl del solvente, *planta control* (Fig. 10). El aceite se repuso cada 3 días, al igual que la acetona en el control. Se registró la herbivoría por hormigas diariamente durante 21 días, tomando fotos de cada una de las plantas. Luego se realizó un análisis cualitativo (por la falta de réplicas) en donde se describió cuál de las dos opciones fue la primera en ser descubierta.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Atracción por diferentes partes de la naranja

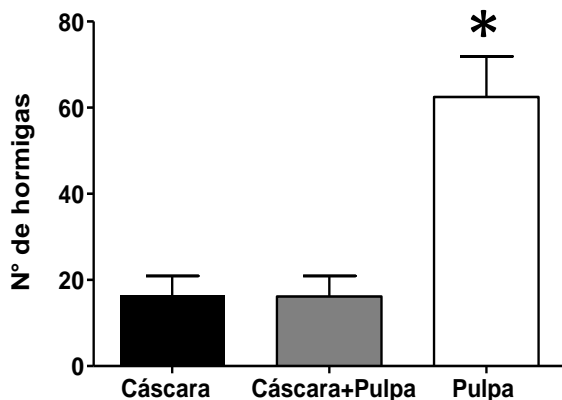


Fig. 11. Preferencia de las hormigas por las diferentes porciones de naranja. Media y error estándar (N=3). El * indica significancia (valor-p < 0,0001)

Las hormigas de la especie *A. ambiguus* presentaron diferente atracción por las distintas porciones de naranja (valor-p < 0,001). Todas las subcolonias prefirieron la *Pulpa* por sobre las otras opciones (valor-p < 0,0001; prueba de Tukey). El número de hormigas registradas en la porción de *Pulpa* fue significativamente mayor que en la de *Cáscara* o en la combinación de ambas (Fig. 11). Estos resultados indicarían que la preferencia por la pulpa se ve disminuida en presencia de la *Cáscara*.

4.3.2. Atracción por volátiles de diferentes partes de la naranja

En este ensayo en donde sólo estuvieron presentes las claves volátiles de las diferentes porciones de la naranja, las hormigas *A. ambiguus*, también prefirieron la *Pulpa* (valor-p < 0,0001; prueba de Tukey) (Fig. 12). Estos resultados indicaron que las hormigas tenían una preferencia similar por la *Pulpa* de naranja ya sea que pudieran entrar en contacto con la opción o no. Y nuevamente, la atracción de la *Pulpa* se redujo en presencia de la *Cáscara*. Esto sugirió que el olor de la Pulpa es una señal atrayente, mientras que los volátiles de la cáscara parecerían generar un efecto negativo en la atracción.

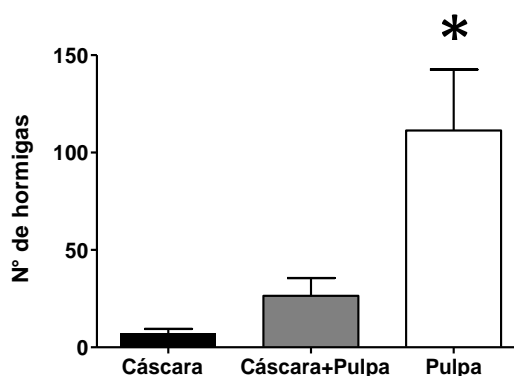


Fig. 12. Preferencia de las hormigas por los volátiles de las diferentes porciones de la naranja. Media y error estándar (N=3). El * indica significancia (valor-p < 0,0001)

4.3.3. Colecta e identificación de compuestos volátiles

En el análisis de volátiles, cuando se comparaban los cromatogramas de cáscara y pulpa, en el primero podía observarse una mayor cantidad de compuestos y concentraciones más altas de los mismos (mayor cantidad de picos y más altos) (Fig. 13).

La identificación de esos compuestos señaló como integrantes principales a mono y sesquiterpenos.

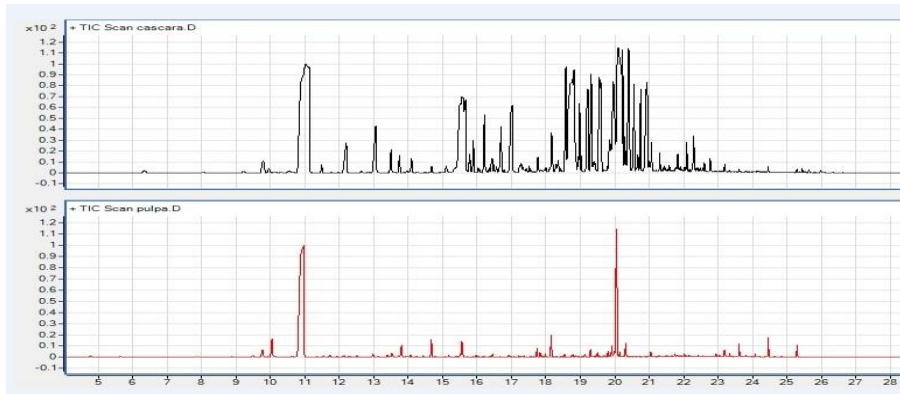


Fig. 13. Cromatogramas de volátiles de porciones de la naranja. Cáscara (arriba), pulpa (abajo). Eje x: Tiempo de retención (min), Eje y: Abundancia.

La cáscara contenía una gran variedad de sesquiterpenos, pero la mayoría de estos compuestos estuvieron ausentes o presentes solo en trazas dentro de los volátiles de la pulpa (Tabla 1).

4.3.4. Ensayos de comportamiento con compuestos volátiles

4.3.4.1. ENSAYO DE PREFERENCIA CON PULPA DE NARANJA

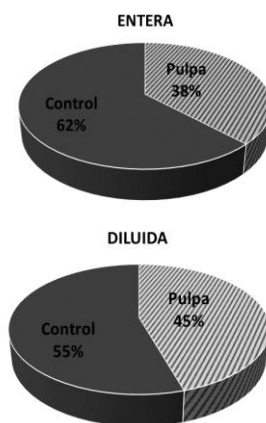


Fig. 14. Porcentaje de número total de hormigas en cada una de las opciones (control, pulpa) en los ensayos con volátiles de pulpa *entera* y *diluida* (N=15).

Los resultados del análisis de χ^2 entre los datos observados de número de hormigas en la mitad del dispositivo a la que llegaban los volátiles de la pulpa, y los esperados de una frecuencia esperada al azar (50% y 50%), resultaron significativos, tanto en los ensayos con la pulpa *entera* (valor-p = $4,67941 \times 10^{-17}$), como con la pulpa *diluida* (valor-p = $1,6549 \times 10^{-6}$). Los

resultados indican que las hormigas evitaron la mitad del dispositivo a la cual le llegaban los volátiles de la pulpa de naranja. Al comparar el efecto en el comportamiento de las hormigas entre la pulpa *Entera* y *Diluida*, no se encontraron diferencias (valor-p = 0,17). Sin embargo, pudo verse en los valores-p de los χ^2 que se reportan en el texto que, en los ensayos con la pulpa *diluida* el resultado es

mucho más cercano al del alfa de 0,05. Lo cual, podría deberse a que a medida que la concentración de volátiles disminuya, el efecto negativo también disminuye (Fig. 14).

Tabla 1. Cromatograma de iones totales obtenido del análisis de volátiles recogidos de pulpa y cáscara de naranja. **TR**: tiempo de retención. **Qual**: porcentaje de coincidencia con la biblioteca. **IK**: Índice de Kovats (retención). **IK lit**: Índice de Kovats de la literatura. **tr**: traza.

TR	Nombre del compuesto	Qual	IK	IK lit	Presencia en	
					Cáscara	Pulpa
4.9	α pinene	97	928	932	-	+
6.05	Sabinene	90	971	969	tr	+
6.06	β pinene	90	972	974	tr	+
6.66	2-octanone	90	991	988	+	+
9.19	Limonene	94	1035	1031	+	+
13.14	Camphor	96	1144	1141	+	+
15.9	α terpineol	90	1193	1186	+	-
19.74	Decanal	98	1208	1201	+	tr
24.87	α cubebene	98	1348	1351	+	-
25.60	Sesquiterpene 1		1360		+	-
26.43	Copaene	96	1374	1376	+	-
27.44	β Elemene	95	1389	1390	+	tr
28.44	Sesquiterpene 2		1405		+	-
28.92	β caryophyllene	99	1414	1419	+	tr
29.56	Sesquiterpene 3		1411		+	-
30.09	α guaiene	99	1435	1439	+	-
30.71	Aromadendrene	97	1446	1439	+	tr
30.81	α -humulene	97	1448	1454	+	-
31.32	Sesquiterpene 4		1456		+	-
31.54	Sesquiterpene 5		1460		+	tr
32.09	Sesquiterpene 6		1469		+	tr
32.51	Germacrene D	98	1476	1481	+	-
32.67	Sesquiterpene 7		1479		+	tr
33.50	Valencene	98	1492	1496	+	+
33.79	α muurolene	98	1496	1500	+	-
33.88	Sesquiterpene 8		1498		+	-
34.34	β Bisabolene	89	1506	1505	+	-
34.50	Sesquiterpene 9		1506		+	tr
35.13	γ Cadinene	95	1521	1513	+	+
38.15	Caryophyllene oxide	93	1574	1583	+	+
47.42	Nootkatone	98	1798	1806	+	+

4.3.4.2. ENSAYO DE ORIENTACIÓN CON PULPA DE NARANJA

El análisis realizado a los resultados de los ensayos con pulpa entera y diluida indicó que, en ambos, no fue significativa la diferencia entre pulpa y control (valor- $p > 0,1$). Las hormigas tampoco se orientaron hacia los volátiles de la pulpa de naranja cuando se le agregó al ensayo el olor “background” con las hojas (valor- $p > 0,1$) (Fig. 15). Al ver los datos, parecía repetirse el patrón que, al diluir la pulpa, el “rechazo” por el olor a naranja disminuía, con lo cual podía ser consecuencia de la concentración de los compuestos. Sin embargo, cuando se evaluó la tercera concentración, donde se utilizaron sólo los discos de papel de filtro impregnados con los volátiles de la pulpa, tampoco se encontraron diferencias significativas (valor- $p > 0,1$). Esto llevó a pensar que tal vez los dispositivos utilizados en este ensayo y en el anterior, no eran los adecuados para evaluar la preferencia de las hormigas por los olores de la pulpa de naranja. Ambos dispositivos eran de acrílico, y eran cerrados una vez que las hormigas se colocaban dentro para realizar el ensayo. Tal vez la saturación del ambiente se daba muy rápidamente, y la concentración de volátiles era muy alta para ese pequeño espacio. Se decidió entonces evaluar esta interacción con el siguiente ensayo.

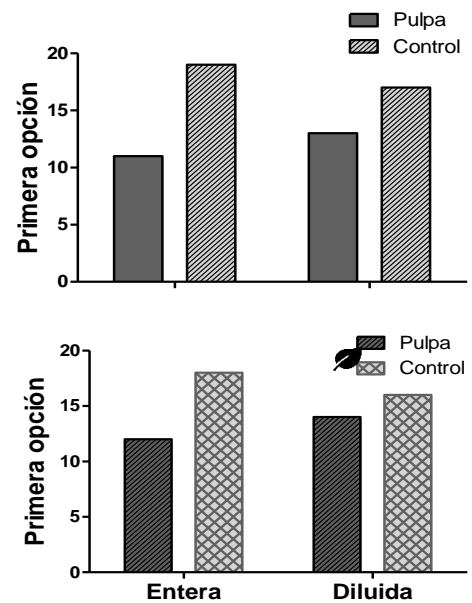


Fig. 15. Las barras indican el número de ensayos en los cuales las hormigas eligieron control o tratado como primera opción. El gráfico de arriba representa los resultados de los ensayos con Pulpa sola, y el de abajo a los cuales se le agregaron hojas (N=30, en ambos ensayos).

4.3.4.3. ENSAYO CON OLFATÓMETRO DE AMBIENTE ESTACIONARIO CON ACEITE ESENCIAL DE NARANJA

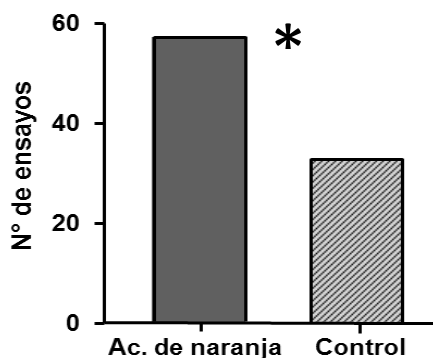


Fig. 16. Elección de las hormigas según la preferencia del olor al aceite esencial de naranja o el control. Las barras indican el número de ensayos en donde cada opción fue elegida (N=90). El * indica significancia (valor- $p = 0,01$)

Este dispositivo, en donde las hormigas eran transportadas hacia el sitio de elección en un contexto de forrajeo, y la manipulación de éstas era mínima, resultó ser mucho más adecuado para diagnosticar la preferencia y orientación por los compuestos volátiles de las hormigas cortadoras de hojas en el laboratorio. Los resultados para el aceite esencial de naranja en una concentración del 1% indicaron que, de 90 hormigas evaluadas, 57 eligieron el aceite de naranja por sobre el control (Fig. 16). La prueba de χ^2 dio significativa (valor- $p = 0,01$), lo que indica que las hormigas elegían fuertemente el lado del dispositivo de dónde provenía el olor a naranja.

4.3.5. Atracción por naranja en el campo

4.3.5.1. ATRACCIÓN POR PULPA DE NARANJA

Los resultados de los ensayos en el campo con la especie *A. lobicornis* realizados en Dina Huapi, indicaron que esta especie de hormiga cortadora es atraída por la pulpa de naranja (valor-p < 0,001). De las 10 colonias evaluadas se registraron en todas, mayor número de hormigas en el disco tratado con pulpa de naranja, en comparación con el control, que muchas veces no era siquiera descubierto en la hora y media que duraba el ensayo (Fig. 17).

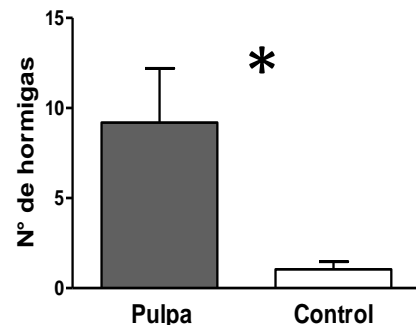


Fig. 17. Media y error estándar del número de hormigas en contacto con los discos de papel de filtro impregnados con pulpa de naranja o con agua (control) (N=10). El * indica significancia (valor-p < 0,001)

4.3.5.2. ATRACCIÓN POR ACEITE ESENCIAL DE NARANJA

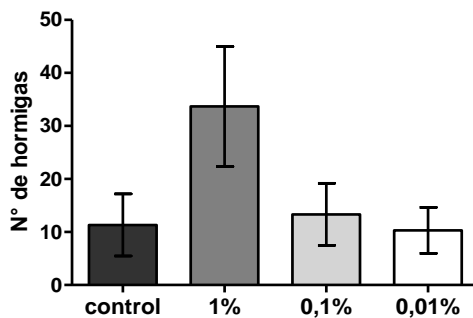


Fig. 18. Evaluación preliminar del comportamiento de atracción de las hormigas por diferentes concentraciones de aceite esencial de naranja. Media y error estándar (N=3).

Las distribuciones Poisson de los datos de estos dos ensayos debieron modificarse a una distribución Binomial negativa para corregir la sobredispersión.

Los resultados del análisis de los datos del primer ensayo, en donde se evaluaron las tres concentraciones de aceite esencial de naranja juntas (1%, 0,1% y 0,01%) más un control con el solvente, resultaron no ser significativos (valor-p > 0,5). Esto indicaría que no hubo preferencia por ninguna de las tres concentraciones. Sin embargo, en el gráfico puede

verse que la concentración de 1% fue la opción que tuvo la mayor concurrencia de hormigas (Fig. 18).

Cuando se evaluaron las tres concentraciones por separado con sus respectivos controles en el segundo ensayo, los resultados indicaron que hubo diferencias significativas entre aceite y control (valor-p < 0,001), las hormigas definitivamente eran atraídas por el olor a aceite esencial de naranja. Pero respecto a las concentraciones como variable explicativa, otra vez no hubo diferencias significativas (valor-p > 0,5). Incluso con la concentración más baja, las hormigas elegían el disco con aceite esencial de naranja por sobre el disco control (Fig. 19).

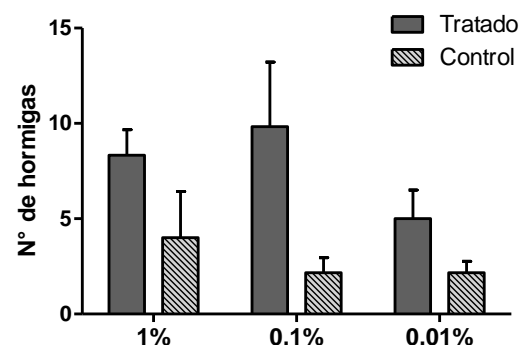







Fig. 19. Evaluación individual de cada concentración de aceite esencial de naranja. Media y error estándar (N=6).

4.3.6. Aceite de naranja como refuerzo de atracción en vegetación palatable

Las plantas a las que se les adicionó el estímulo de aceite esencial de naranja (*tratadas*), fueron descubiertas y cortadas antes que las plantas sin aceite (*control*) por las hormigas de la especie *A. lundii* (Tabla 2). Una vez descubiertas, estas plantas fueron totalmente defoliadas en un periodo de 3 días. Las plantas control de *V. bonariensis* y *L. japonica* mantuvieron el 100% de sus hojas hasta finalizado el ensayo (las *plantas tratadas* de estas especies fueron las últimas en ser descubiertas y cortadas). El caso de *L. sinense* es particular, se sabe de ensayos anteriores que es una especie altamente preferida por las hormigas cortadoras de hojas, por lo que se registró el mismo momento de descubrimiento de la especie tanto de la planta tratada como control. Y, por último, *A. fructicosa* no fue dañada por las hormigas en el periodo registrado, y como el ensayo se realizó entre marzo y abril, luego empezó a perder las hojas y no se pudo continuar la observación.

Tabla 2. Las hormigas indican la opción de tratamiento seleccionada por las hormigas cortadoras, y el día en que empezaron a ser cortadas.

Especies	Tratadas	Control
<i>Ligustrum sinense</i>	 (día 2)	 (día 2)
<i>Iris pseudacorus</i>	 (día 4)	-
<i>Verbena bonariensis</i>	 (día 19)	-
<i>Lonicera japonica</i>	 (día 21)	-
<i>Amorpha fructicosa</i>	-	-

4.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La naranja es un atrayente muchas veces utilizado para las hormigas cortadoras de hojas, sin embargo, no había sido evaluado con esta función para las especies con las que se trabajó en estos experimentos. Los resultados presentados en este capítulo demuestran que *Acromyrmex ambiguus* y *A. lobicornis* son atraídas tanto por la pulpa, como por los volátiles del aceite esencial de naranja. *A. lundii* fue evaluada en contexto de campo, y también presentó atracción por los volátiles del aceite esencial de naranja. Con lo cual, estas tres especies se sumarían a las otras mencionadas en los trabajos citados en la introducción donde la atracción por la naranja fue evaluada positivamente.

A lo largo de los experimentos con este estímulo *pull*, aparecieron las dificultades que implica el trabajar con insectos sociales, como lo son las hormigas cortadoras de hojas. En estos insectos la toma de decisiones es muy compleja ya que no depende solo de un individuo, sino del aprendizaje de toda la colonia (Roces & Núñez, 1993). En los dispositivos de acrílico utilizados en los ensayos en laboratorio con *A. ambiguus* para evaluar el comportamiento frente a los volátiles de la pulpa de naranja, los resultados no son confiables, ya que las hormigas cuando comenzaba el ensayo no mostraban un comportamiento de forrajeo, sino más bien, parecían querer escapar durante toda la duración del

experimento. Si bien las hormigas fueron transportadas con sumo cuidado hasta el dispositivo para no alterarlas antes del experimento, y se esperó un periodo de tiempo de adaptación, no se logró el contexto de forrajeo necesario para un experimento de preferencia⁷. Se consideró la posibilidad de que este comportamiento ocurriera a raíz de que la concentración de volátiles fuera muy alta para ese espacio pequeño, y que esto ocasionó un comportamiento de evitación en las hormigas. Esta situación había sido reportada previamente para otras hormigas cortadoras (Littleddyke & Cherrett, 1978; Mudd *et al.*, 1978), justificando este cambio de comportamiento a causa de la mayor concentración de *d-limoneno* (Verza *et al.*, 2011). En los ensayos en laboratorio con las subcolonias de *A. ambiguus*, también se pudo verificar que la presencia de la cáscara (que tiene mayor concentración de compuestos volátiles) disminuía el efecto atrayente de la pulpa.

Las diferencias entre los volátiles de la pulpa y la cáscara han sido estudiadas por diferentes autores a través de una variedad de técnicas, donde se reportaron diferentes cantidades, proporciones y ligeras diferencias en componentes (Hernandez *et al.*, 1996; Qiao *et al.*, 2008). Cuando se evaluaron cualitativamente los componentes volátiles presentes en la cáscara y en la pulpa de naranja, se encontró que muchos volátiles de la cáscara aparecen como trazas en la pulpa, lo que sugiere que es posible que el efecto repelente de la cáscara en comparación con el atrayente de la pulpa esté relacionado con la concentración de metabolitos secundarios repelentes. Otra posibilidad es que la cáscara no sea tan atrayente como la pulpa debido a sesquiterpenos específicos que solo están presentes en la cáscara, esto debería ser objeto de un análisis químico más profundo.

Se puede afirmar que la naranja es atrayente para estas hormigas, tal vez la concentración de compuestos volátiles que las hormigas perciben como atrayente es muy baja. Sin embargo, si se deja una porción de naranja (cáscara, pulpa, ambas) en el campo, en donde la concentración de los volátiles de la fruta va a ser sumamente baja, en unos minutos la fruta se llena de hormigas cortadoras de hojas (*observación personal*). A raíz de los resultados y de esta observación, es que se planteó el último ensayo, en donde se decidió evaluar si el aceite esencial de naranja podría ser utilizado para orientar a las hormigas hacia una alternativa de corte que no fuera el cultivo. Se utilizaron plantas con potencial como alternativa de corte, y en todos los casos, las plantas con aceite esencial de naranja fueron las primeras en ser descubiertas. Esto implica que el aceite fue un estímulo atrayente de largo alcance, y que esto puede ayudar a desviar la atención de las hormigas sobre el cultivo.

⁷ También se realizaron ensayos de preferencia con un olfatómetro en Y de vidrio, los cuales tampoco fueron exitosos.



CAPÍTULO 5: ESTRATEGIA PUSH-PULL



5.1. INTRODUCCIÓN

Push-pull es una estrategia de manejo integrado de plagas, que implica la manipulación conductual de los insectos, integrando estímulos que hacen que el recurso protegido sea poco atractivo o inadecuado para las plagas (estímulo *push*), mientras los atrae hacia una fuente atrayente (estímulo *pull*), donde la población plaga puede ser reducida, o simplemente distraída del ataque al cultivo de interés (Cook *et al.*, 2007). En los capítulos anteriores se estudió el potencial de diferentes estímulos para ser usados en este tipo de estrategia. Para el estímulo *push* se evaluó el farnesol (Capítulo 2), con muy buenos resultados como repelente de *Acromyrmex ambiguus* en dosis relativamente bajas, 50 y 100 mg, y se concluyó que actúa a nivel de contacto. Como estímulo *pull* se estudió la vegetación de crecimiento espontáneo (Capítulo 3), y la naranja (Capítulo 4). En el caso de la vegetación se pudo concluir que las hormigas no poseen una preferencia de corte especial por el sauce, y que, si hay vegetación de crecimiento espontáneo, son capaces de seleccionar otras plantas para cortar, disminuyendo la presión de forrajeo sobre el cultivo. Cuando se estudió la atracción por la naranja en las especies de hormigas cortadoras *Acromyrmex ambiguus* y *A. lobicornis*, se pudo concluir que la pulpa de esta fruta actúa exitosamente atrayéndolas, incluso sólo con sus compuestos volátiles. Lo mismo ocurrió con el aceite esencial de naranja para ambas especies, y también para *Acromyrmex lundii* la cual fue direccionada hacia una alternativa de corte puntual como producto de esa atracción.

Lo particular de la estrategia *push-pull* es justamente utilizar los dos estímulos en simultáneo, para sinergizar sus efectos, y mejorar los resultados que se obtienen al emplearlos individualmente. Esta estrategia se ha utilizado con éxito en varios sistemas agrícolas, por ejemplo, para controlar *Striga* sp. en la producción de cereales subsahariana (Cook *et al.*, 2007; Amudavi *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Pickett *et al.*, 2014), *Helicoverpa* sp. en cultivos de algodón (Pyke *et al.*, 1987; Duraimurug & Regupathy, 2005) y la mosca *Rhagoletis cerasi* en la cereza (Aluja & Boller, 1992). También se ha utilizado en sistemas forestales para controlar el escarabajo del pino de montaña *Dendroctonus ponderosae* en *Pinus contorta* (Lindgren & Borden, 1993; Borden *et al.*, 2006; Gillette *et al.*, 2012). Sin embargo, nunca se ha evaluado en hormigas cortadoras de hojas ni en ninguna otra especie de insecto social.

Este trabajo se realizó en el Delta del Río Paraná en Buenos Aires, Argentina. Esta área es parte de uno de los ecosistemas de humedales más extensos de América del Sur. Los humedales se encuentran entre los ecosistemas más diversos debido a la flora y fauna que los habita, y se consideran los

ecosistemas más productivos del mundo (Y. V Sica *et al.*, 2016). Sin embargo, el Delta inferior del Río Paraná se está modificando rápidamente: aproximadamente 83.000 ha de la cubierta vegetal original han sido reemplazadas por plantaciones de Salicáceas (Borodowski, 2011), y la cantidad de ganado ha aumentado en un orden de magnitud a lo largo de una década (Y. V Sica *et al.*, 2016). Este tipo de producciones conllevó a una drástica modificación de la tierra, con la construcción de diques que cambiaron la circulación natural del agua del humedal, generando espacios de tierras altas, no inundables, donde estas producciones se hicieron más rentables. Sin embargo, la modificación del humedal genera grandes cambios en el ecosistema, que deberían ser tenidos en cuenta a la hora de planificar un manejo de plagas sustentable.

El trabajo realizado y presentado en este capítulo, tuvo como **objetivo** evaluar, a diferentes escalas, aquellos estímulos estudiados en los capítulos anteriores, combinándolos en una estrategia *push-pull* para el manejo de las hormigas cortadoras de hojas en plantaciones de sauces jóvenes en el Bajo Delta del Río Paraná. La **hipótesis** es que la estrategia *push-pull*, utilizando el farnesol como estímulo *push*, y la naranja y/o la vegetación de crecimiento espontáneo como estímulo *pull*, es efectiva para manejar a las hormigas cortadoras de hojas en las plantaciones forestales de sauces. Con lo cual se **predice** que la estrategia *push pull* disminuye el daño causado por las hormigas cortadoras de hojas en los sauces, ya que el farnesol protegerá a las plantas de sauce repeliendo a las hormigas cortadoras, y simultáneamente, éstas serán atraídas por los volátiles de naranja, o por la opción de la vegetación de crecimiento espontáneo como una alternativa de corte.

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Ensayos en laboratorio

Los experimentos se realizaron con colonias enteras. Se utilizó como arena de forrajeo una cuba de plástico (33 x 46 x 12 cm), en la misma se ubicaron dos grupos de estacas de sauce (22 cm de largo y 1,5 cm de diámetro) separados por 25 cm. Cada grupo constó de cuatro estacas, y cada estaca fue rodeada por un hilo de algodón de 25 cm de largo sujeto en la mitad (11 cm de altura) formando una banda de 1 cm aproximadamente. En el extremo superior de cada estaca se ubicaron unos pequeños recipientes de plástico (1,4 cm de diámetro y 1,4 cm de alto) con hojuelas de avena, a modo de oferta alimenticia *ad libitum*.

El experimento consistió en evaluar la eficacia de la estrategia *push-pull*, frente a la opción de utilizar sólo el farnesol como repelente.

Se evaluaron 2 concentraciones de farnesol con 100 mg de lanolina como vehículo, se utilizó esta cantidad ya que es la necesaria para embeber completamente un hilo de algodón de 25 cm. Cada hilo

de algodón ya embebido fue sujetado a la altura media de cada estaca (*estacas push*). Las concentraciones fueron:

-100 mg de farnesol en 100 mg de lanolina

-50 mg de farnesol en 100 mg de lanolina

Estas dos concentraciones fueron probadas independientemente en 2 experimentos diferentes:

- PUSH-PULL: Uno de los grupos de estacas fueron *estacas push*, y el otro las *estacas pull*. A este último grupo de estacas se les agregó en la parte superior un recipiente de aluminio con 1,5 g de pulpa naranja, y se aisló ese extremo con una jaula de malla plástica. De esta forma, el estímulo *pull* consistía solo en los volátiles de la pulpa. Se agregó una jaula también a las *estacas pull* para que los grupos solo se diferenciaron en los estímulos (Fig. 1).

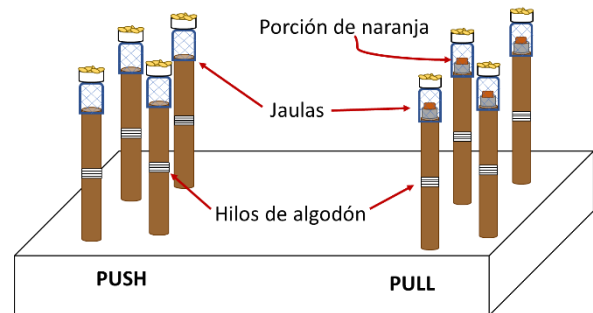


Fig. 1. Esquema de experimento *push-pull*

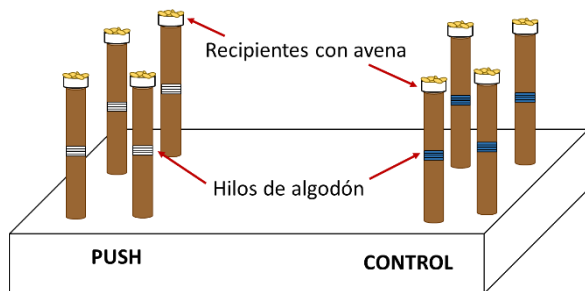


Fig. 2. Esquema experimento *push-control*

- PUSH-CONTROL: Uno de los grupos de estacas fueron *estacas push*, y el otro grupo *estacas control*. Estas últimas tenían el hilo de algodón embebido solo en 100 mg de lanolina (Fig. 2).

En cada ensayo se registró el número de hormigas caminando a través del hilo de algodón de cada estaca durante un intervalo de 30 segundos. Las hormigas se contaron independientemente si se movían hacia arriba o hacia abajo de la estaca. Se realizaron tres observaciones separadas por 3 horas. Se utilizaron seis colonias diferentes con cada experimento.

La variable respuesta que se evaluó estadísticamente se construyó a partir del número de hormigas que cruzó el hilo en las *estacas push*, dividido por el número total de hormigas que se registraron en cada ensayo, y se la nombró: *proporción de hormigas en el repelente*. Los resultados se analizaron con un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) con una distribución binomial, utilizando el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015) en el programa R (R Core Team, 2019). La parte fija del modelo incluyó las variables categóricas *Dosis* (50 y 100 mg) y *Tratamiento* (push-control y push-pull), y en la parte aleatoria se incluyó como variables anidadas: *Colonia*, y *Tiempo* (por las tres mediciones realizadas con tres horas de diferencia).

5.2.2. Ensayos en el campo por colonia: Farnesol + Naranja

Los ensayos se realizaron en la Estación Experimental Agropecuaria Delta del INTA en el distrito de Campana en Buenos Aires, durante enero de 2016. Se identificaron seis colonias de *A. ambiguus* y se eligieron dos senderos activos de forrajeo de cada nido. Los ensayos consistieron en colocar a cada lado de los senderos dos estacas separadas del mismo por 5 cm, y en la parte superior de las estacas se colocaron 2 hojas frescas de sauce (*Salix babylonica* var. *Sacramento* "Soveny Americano") (Fig. 3). En cada nido se realizaron dos ensayos:

- PUSH-PULL: A una de las estacas se le untó farnesol en lanolina (100 mg de farnesol en 100 mg de lanolina) en la mitad de su altura, formando una banda de 2 cm aproximadamente, *estaca push*. Y a la otra estaca se le colocó una porción de 1,5 g de pulpa de naranja sobre las hojas en la parte superior como atrayente, *estaca pull*.

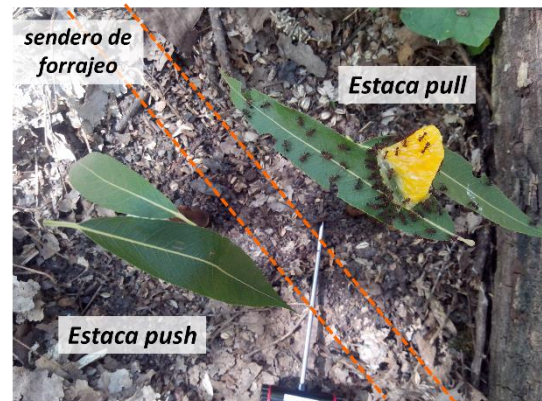


Fig.3 Ensayo a campo Farnesol+Naranja.

- PUSH-CONTROL: A una de las estacas se le untó farnesol en lanolina (100 mg de farnesol en 100 mg de lanolina) en la mitad de su altura, formando una banda de 2 cm aproximadamente, *estaca push*. Y a la otra no se le aplicó ningún tratamiento, solo tenía disponible las hojas en su parte superior, al igual que las otras estacas, *estaca control*.

Se registró el número de hormigas sobre las hojas en cada estaca de los tratamientos, cada media hora durante dos horas y media. Durante ese periodo no se registró la presencia de hormigas sobre las *estacas push* de ninguno de los tratamientos, en ninguna de las 6 colonias. Sí se observó, y cuantificó el número de hormigas sobre las *estacas pull* y *control*, con lo cual se realizó un análisis con un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) con una distribución Poisson, utilizando el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015) en el programa R (R Core Team, 2019), para evaluar si hubo diferencias entre las estacas con y sin atrayente. La parte fija del modelo incluyó la variable *Tratamiento* (push-control y push-pull), y en la parte aleatoria se incluyó como variables anidadas: *Colonia*, y *Tiempo*.

5.2.3. Ensayos en el campo en plantaciones de sauces jóvenes: Farnesol y Barrera mecánica + Vegetación de crecimiento espontáneo

Los ensayos se realizaron en campos de dos pequeños productores de la zona Núcleo Forestal del Delta del Paraná. Estos dos campos (sitios) poseían condiciones ambientales contrastantes:

-En el **sitio A** (34°06'49.6"S 58°49'55.8"O), el terreno fue modificado por la construcción de diques, por lo que el riego se realiza artificialmente a través de compuertas que llevan agua a un sistema de zanjas, el suelo suele estar seco, la vegetación de crecimiento espontáneo es poco diversa y el número de nidos de *Acromyrmex ambiguus* en la zona donde se realizó el experimento fue de 4.

-En el **sitio B** (34°09'37.4"S 58°49'53.5"W), el terreno no fue modificado, el agua puede entrar y salir del campo libremente con los movimientos de inundación naturales del humedal, la vegetación de crecimiento espontáneo es diversa y abundante (con muchas especies seleccionadas por las hormigas), y el número de nidos de *Acromyrmex ambiguus* en el zona donde se realizó el experimento fue de 1, en una superficie elevada (arriba de un árbol, a una altura aproximada de 1,20 m), de esta forma no quedaba sumergido cuando subía el nivel del agua.

Este ensayo sólo se pudo realizar en estos dos campos a causa de que la movilidad es complicada en esta parte de las islas del Delta del Paraná porque no hay muchos caminos, y porque encontrar campos donde los productores no controlen químicamente a las hormigas es muy difícil.

Para este diseño se utilizó como estímulo repelente (*push*), una barrera mecánica comercial (consiste en una goma espuma cubierta con un plástico que se ubica alrededor del tallo del árbol) comúnmente utilizada por los productores con muy buenos resultados (Jiménez, 2019), más farnesol (100 mg de farnesol en 100 mg de lanolina), untado directamente sobre el tallo formando una banda de 2 cm, debajo de la barrera mecánica. Como estímulo atrayente (*pull*), se mantuvo la vegetación de crecimiento espontáneo de cada sitio.

El ensayo consistió en cuatro parcelas en un diseño de parcela dividida. Cada parcela incluyó doce plantas jóvenes de sauce (*Salix babylonica*) plantados en dos hileras separadas por 1,5 m. Dentro de cada parcela había dos materiales de plantación diferentes (subparcelas) que los productores suelen utilizar: seis *estacas* de sauce (porción de 30 cm del tallo de sauce) y seis *guías* (porción de 2 m del tallo de sauce). Las estacas, en comparación con las guías, son más económicas, poseen menor cantidad de yemas de rebrote, menores reservas, con lo cual su supervivencia es más baja. Las guías, por su tamaño, son generalmente más usadas por los productores que tienen un sistema productivo silvopastoril (forestal + ganado), y se caracterizan por tener un costo mayor, poseer mayor cantidad de yemas de rebrote y mayor cantidad de reservas, con lo cual tienen una mayor supervivencia.

Las parcelas estaban separadas entre sí por 10 m aproximadamente. El diseño incluyó los siguientes cuatro tratamientos experimentales (Fig. 4):

- **PUSH-PULL:** las plantas jóvenes de sauce estaban protegidas por el estímulo repelente (farnesol + barrera mecánica), y como atrayente se mantuvo la vegetación de crecimiento espontáneo alrededor de las mismas.
- **PUSH:** se utilizó el estímulo repelente (igual que el tratamiento anterior), pero la vegetación de crecimiento espontáneo se eliminó mecánicamente durante todo el ensayo.
- **PULL:** se mantuvo la vegetación de crecimiento espontáneo, pero no se protegieron las plantas jóvenes de sauce con el estímulo repelente.
- **CONTROL:** se eliminó mecánicamente la vegetación de crecimiento espontáneo durante todo el ensayo y no se protegieron las plantas jóvenes de sauce.

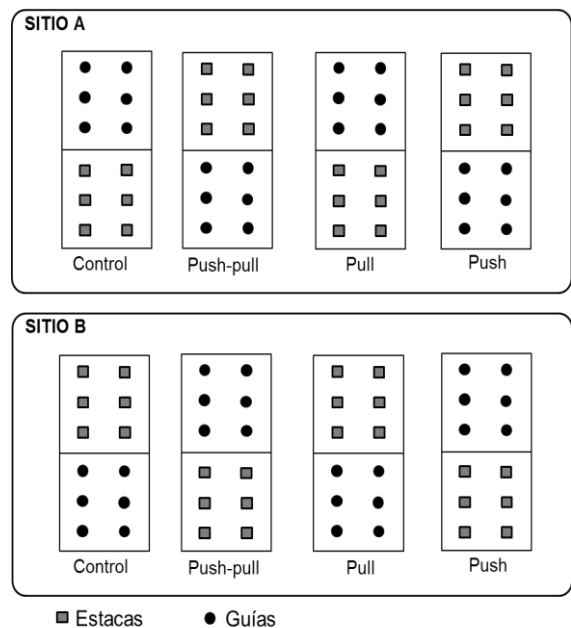


Fig. 4. Esquema del diseño de parcela dividida del ensayo push-pull en plantaciones jóvenes de sauces.



Fig. 5. Metodología del fondo gris para estimar porcentaje de follaje remanente

Cada planta joven de sauce se fotografió sobre un fondo gris a lo largo de la temporada de crecimiento (Fig. 5), comenzando en noviembre de 2017, y durante cinco meses hasta marzo de 2018. Se estimó el porcentaje de follaje remanente en cada medición, tomando como 100% el follaje de la primera medición para cada planta (si en las mediciones posteriores, debido al crecimiento, el porcentaje de follaje era superior a ese 100%, seguía

considerándose 100%). Como variable respuesta del experimento, se tomó el porcentaje de follaje remanente al final de la temporada de crecimiento (es decir, marzo).

Los resultados se analizaron con un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM), utilizando el paquete lme4 (Bates *et al.* 2015) en el software R (R Core Team, 2019). La parte fija del modelo incluyó las

variables categóricas *Material de plantación* (estacas y guías) y *Tratamiento* (push-pull, push, pull y control), y en la parte aleatoria se incluían como variables anidadas: *Sitio*, *Parcela* y *Subparcela*.

Si bien este ensayo se diseñó con dos variables predictoras (*Material* y *Tratamiento*), se tuvo en consideración las condiciones ambientales de cada campo y cómo afectaron la variable respuesta (*Porcentaje de follaje remanente*). Por lo tanto, para evaluar el efecto de los tratamientos en cada condición ambiental, los sitios A y B se analizaron por separado con un modelo lineal generalizado mixto. Utilizando *Material* y *Tratamiento* como variables fijas, y como aleatorias *Parcela* y *Subparcela* anidadas.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Ensayos en laboratorio

Los resultados del análisis indicaron que hubo una diferencia significativa de la proporción de hormigas sobre las *estacas push* tanto entre la variable *Dosis* (valor- $p < 0,0001$), como entre en la variable *Tratamiento* (valor- $p < 0,0001$), pero la interacción entre ambas variables no fue significativa (valor- $p = 0,41$) (Fig. 6). La dosis de 100 mg de farnesol fue más efectiva en repeler a las hormigas, la proporción no llegó ni a un 0,2 de la cantidad total de hormigas que caminaron sobre las estacas. Y en el caso de los tratamientos, al utilizar un atrayente simultáneamente con el repelente (*push-pull*) la proporción de hormigas que intentaban cruzar el hilo con farnesol en las *estacas push*, fue alrededor del 0,1 o menor.

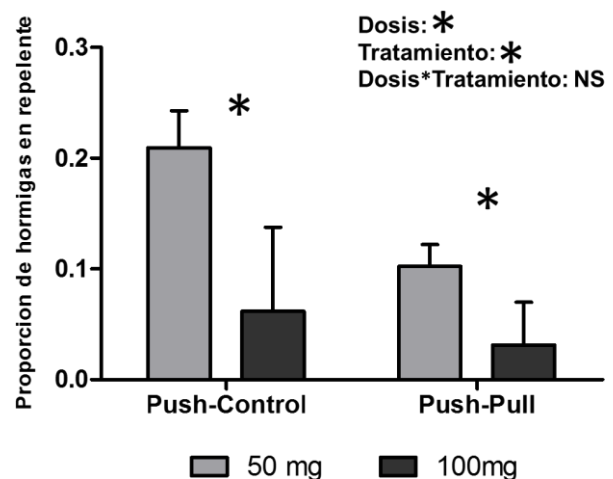


Fig. 6. Media y error estándar de hormigas sobre las estacas tratadas con farnesol. El * indica significancia (valor- $p < 0,0001$), NS indica no significativo (N= 6).

5.3.2. Ensayos en el campo por colonia: Farnesol + Naranja

Como se mencionó en la metodología, no se registró ninguna hormiga en las estacas tratadas con farnesol (*estacas push*) en ninguno de los dos tratamientos, con lo cual el efecto del farnesol fue lo suficientemente repelente para proteger las estacas que fueron ofrecidas. Estos resultados no permitieron realizar un análisis estadístico sobre el efecto repelente del farnesol en presencia de la naranja. Por lo tanto, el análisis se realizó para comparar el número de hormigas presentes en las estacas *control* y *pull*, estas últimas tratadas con pulpa de naranja (Fig. 7). El resultado del análisis

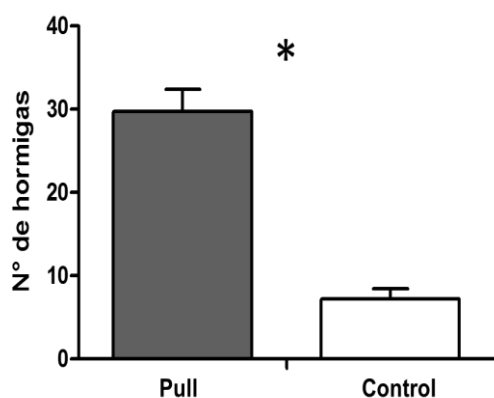


Fig. 7. Diferencia en el número de hormigas sobre *estacas pull* y *estacas control*. El * indica significancia (valor-p < 0,0001). Media y error estándar (N= 6).

indicó que hubo diferencias entre ellas, el número de hormigas que subieron las estacas de sauce tratadas con naranja fue significativamente mayor al número de hormigas que subió a las *estacas control* (valor-p < 0,0001).

Este ensayo no permitió determinar si el efecto repelente del farnesol se incrementó mediante la adición de un atrayente en las proximidades. Sin embargo, estos resultados demuestran una vez más, que la pulpa de naranja mejora el atractivo de las plantas y sugiere que se podría usar en combinación con farnesol en un entorno *push-pull*.

5.3.3. Ensayos a campo en plantaciones jóvenes: Farnesol y Barrera mecánica + Vegetación espontánea

El porcentaje de follaje remanente para el tratamiento *push-pull* en ambos sitios fue el más alto (60% para estacas y hasta 80% para guías). En los tratamientos *control*, *push* y *pull* el mismo se redujo al 40% o menos (Fig. 8). El análisis con el GLMM demostró que la variable *Tratamiento* fue significativa (valor-p < 0,001), y la prueba de Tukey

indicó que el *push-pull* fue el tratamiento que se diferenció del resto (valor-p < 0,01). El análisis no fue significativo para la variable *Material de plantación* o la interacción entre las variables (valor-p = 0,08 y 0,09 respectivamente). Cuando los sitios se analizaron por separado, ambos mostraron diferencias significativas en la variable *Tratamiento* (valor-p = 0,01 en el sitio A, y 0,04 en el sitio B), y no significativas para la interacción

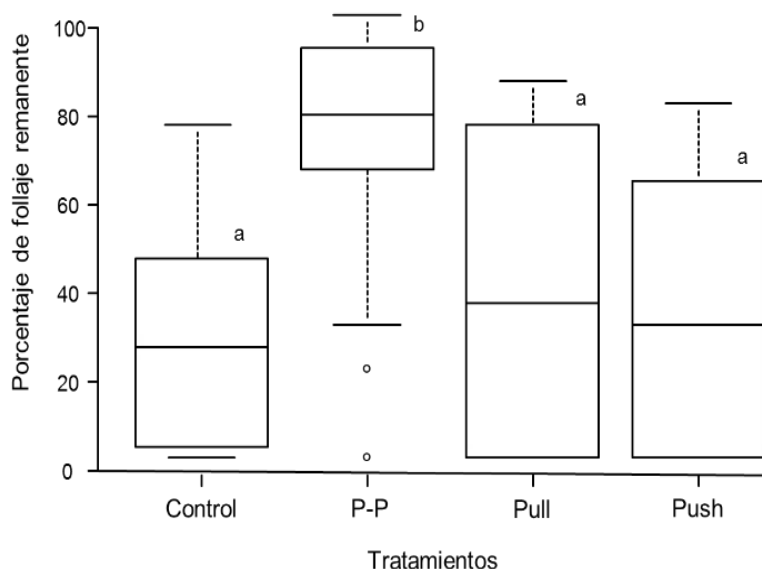


Fig. 8. Porcentaje de follaje remanente para los cuatro tratamientos. Las cajas indican el rango del primer al tercer cuartil, la línea horizontal indica la mediana, los bigotes el rango y los círculos los outliers. Las letras diferentes indican significancia calculada con la prueba de Tukey (valor-p < 0,05, N= 24).

entre las variables (valor-p = 0,31 para el sitio A, y 0,14 para el sitio B) (Fig. 9). En el **sitio A**, el tratamiento *push-pull* tuvo los valores más altos de porcentaje de follaje remanente (más del 60%) y ninguna muerte de plantas de sauce. Las plantas de sauce que crecieron bajo los otros tres tratamientos, *control*, *pull* y *push*, fueron altamente atacadas (por debajo del 30% de follaje remanente) y hubo un 53% de mortalidad (Fig. 9a). En el **sitio B**, el porcentaje de follaje remanente fue alto tanto en el tratamiento *push-pull* como en el *pull* (alrededor del 80%), mientras que disminuyó en los tratamientos *control* y *push*, y solo hubo un 8% de mortalidad de sauces (Fig. 9b). En este campo, la variable *Material de plantación* mostró diferencias significativas importantes (valor-p = 0,009).

En un análisis temporal descriptivo se puede ver que, en todos los casos (incluidos *estacas* y *guías* en ambos sitios), el porcentaje de follaje remanente en el tratamiento *push-pull* se mantuvo en los niveles más altos durante toda la temporada (Fig. 10). Cabe destacar que en el **sitio A**, las plantas de sauce de los otros tratamientos terminaron el ensayo con menos del 10% de follaje (en algunos casos se redujo a 0%), mientras que en el **sitio B** el porcentaje mínimo de follaje remanente fue de aproximadamente 40%.

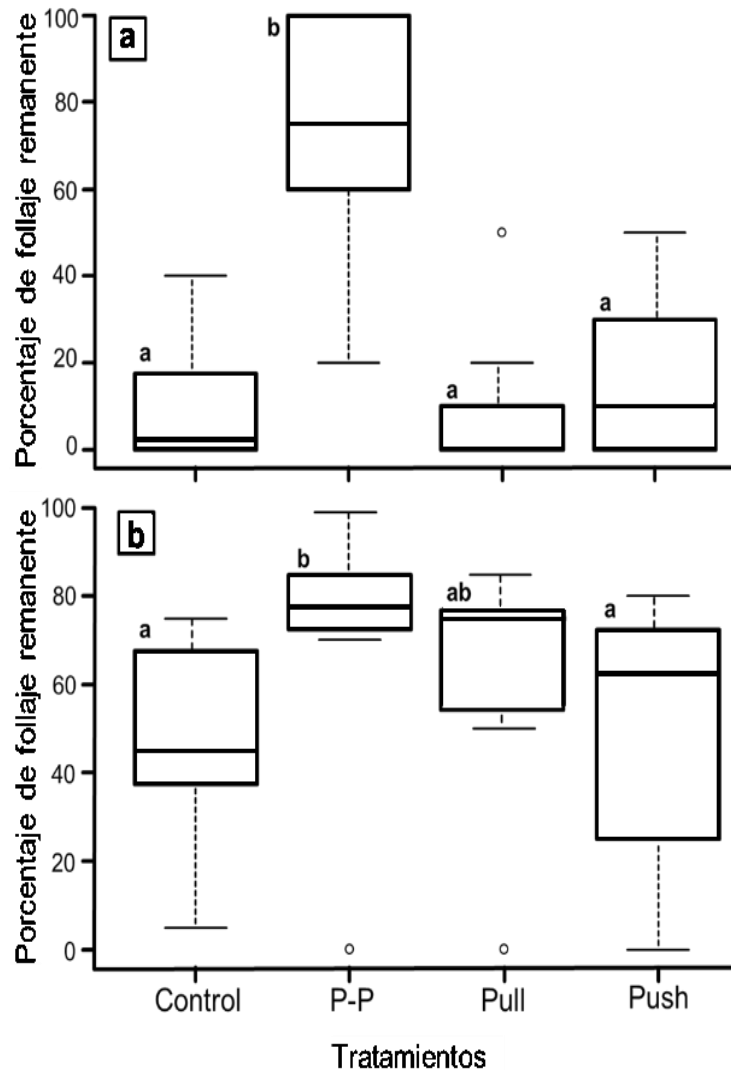


Fig. 9. Porcentaje de follaje remanente al final del experimento para cada tratamiento en cada sitio: a) Sitio A, terreno modificado y b) Sitio B, terreno con movimiento natural del agua. Las cajas indican el rango del primer al tercer cuartil, la línea horizontal indica la mediana, los bigotes el rango y los círculos los outliers. Las letras diferentes indican significancia calculada con la prueba de Tukey (valor-p < 0,05, N= 12).

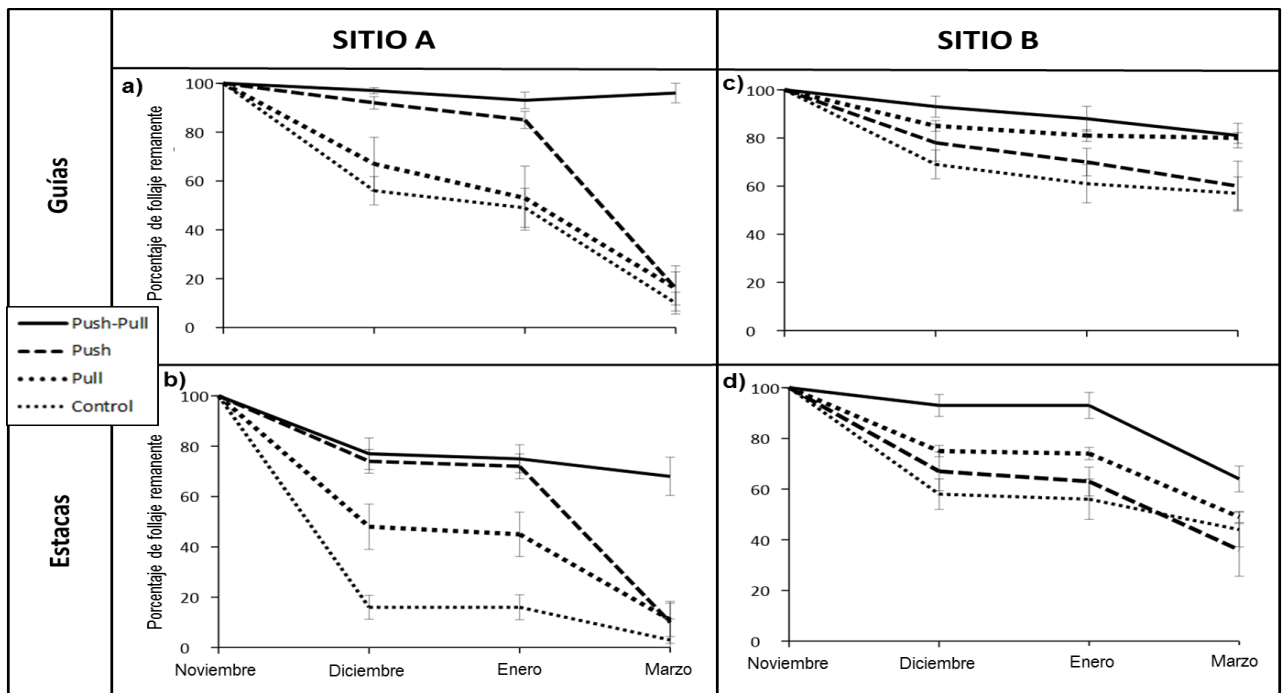


Fig. 10. Porcentaje de follaje remanente (media, EE) registrado cada mes en cada tratamiento: *Push-pull* (línea entera), *Push* (línea interrumpida), *Pull* (línea de puntos grandes) y *Control* (línea de puntos pequeños). a) y b) son guías y estacas en el sitio A respectivamente, c) y d) guías y estacas en el sitio B. N=6 en todos los casos.

5.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El desempeño de los estímulos *push* y *pull*, utilizados simultáneamente, se evaluó a varias escalas, para el manejo de hormigas cortadoras de hojas. Se pudo demostrar, en los ensayos de laboratorio, que el efecto repelente del farnesol se sinergiza en presencia de los compuestos volátiles de la pulpa de naranja como atrayente hacia una fuente alternativa del cultivo a proteger. En una escala mayor, se llevó esta combinación de estímulos a un contexto de campo, y se evaluó a nivel colonia. Si bien este ensayo de campo expuso una vez más la atracción por la pulpa de naranja y la repelencia del farnesol, no se pudo demostrar que el atrayente sinergiza con el farnesol aumentando su efecto repelente, porque no se observaron hormigas en ninguno de los tratamientos con farnesol. Se supone que la dosis de farnesol utilizada en el ensayo fue lo suficientemente alta como para repeler completamente a las hormigas, sin dejar margen para mejorar su eficacia en el tiempo en el que se registraron los resultados de este ensayo (Perri *et al.*, 2017).

En el último ensayo se simuló una plantación de sauces jóvenes tal como suelen ser plantados por los productores en la zona, y se mantuvo la estrategia *push-pull* durante toda una temporada de crecimiento. A raíz de estas condiciones a campo, en este ensayo se decidió utilizar otra combinación de los estímulos evaluados en capítulos anteriores: como estímulo *push* se utilizó el farnesol en dosis de 100 mg (la misma con la que se obtuvo muy buenos resultados en el ensayo anterior), más una

barrera mecánica que los productores ya utilizan, como refuerzo del repelente. Como estímulo *pull*, esta vez, se utilizó la vegetación de crecimiento espontáneo presente en cada sitio. Los resultados de este ensayo demostraron que la estrategia *push-pull* se puede utilizar con éxito para controlar las hormigas cortadoras de hojas en plantaciones de sauces jóvenes (Perri *et al.*, 2020).

En el diseño de la estrategia evaluada a campo en la plantación de sauces jóvenes, se tuvo en cuenta la biología de este tipo de hormigas, esto determinó el uso de estímulos con diferentes rangos de acción: mientras que el estímulo *push* (farnesol más barrera mecánica) actuó como un repelente de corto alcance, el estímulo *pull* (vegetación de crecimiento espontáneo) actuó como un estímulo de largo alcance. Para que el estímulo *push* funcione como repelente, las hormigas deben trepar por la planta y ponerse en contacto con farnesol para decidir abandonar la fuente de alimento. Por el contrario, el estímulo *pull* desvió a las hormigas al tener otras opciones de plantas para cortar, evitando que se acercaran al recurso protegido. Se sabe que las hormigas cortadoras de hojas se orientan básicamente por claves químicas (Littleddyke & Cherrett, 1978). En este caso, donde la arquitectura de la vegetación es más diversa que en un campo de monocultivo, los olores mezclados de la oferta de plantas alternativas pueden "enmascarar" el hallazgo de los sauces jóvenes. Además, las hormigas cortadoras de hojas son herbívoros generalistas, por lo tanto, al proteger las plantas de sauce con la barrera *push*, solo se está bloqueando una de las opciones de corte. Esta combinación de estímulos, *push* de corto alcance y *pull* de largo alcance, encuadran esta estrategia *push-pull* en la clasificación tipo III del marco presentado por Eigenbrode *et al.* (2016). Si bien es una de las combinaciones de estímulos menos utilizada para el manejo de plagas, parece ser una opción óptima para las hormigas cortadoras de hojas.

Los productores que están interesados en los sistemas silvopastoriles usan guías como material de plantación, ya que éste, al ser más alto, les da la oportunidad de introducir ganado más rápidamente en el campo. Además, otra ventaja de usar guías es evitar el uso de vegetación de crecimiento espontáneo como puente por donde las hormigas pueden sortear la barrera mecánica, ya que este material es más alto que las estacas. Además de las guías, varios productores locales ya adoptaron la barrera mecánica que se utilizó como parte del estímulo *push*, con muy buenos resultados. El agregado de farnesol como barrera química ayudaría a reforzar el estímulo repelente, porque de esta manera las hormigas deben cruzar ambos obstáculos para llegar al recurso.

Como se explicó anteriormente, cada campo donde se evaluó la estrategia *push-pull* tenía diferentes condiciones ambientales que deben considerarse en la implementación de este tipo de manejo integrado. La disponibilidad de agua es la más importante de ellas, porque tiene implicancias en la colonización y mantenimiento de los nidos por las hormigas y, además, condiciona el tipo de vegetación presente en el sitio. Esta característica podría modificar fuertemente el éxito de la estrategia *push-pull*. En el sitio B, donde el agua tiene el movimiento natural de inundación del

humedal, solo había un nido de *A. ambiguus* y el mismo se encontraba en una parte alta de un árbol, de esta forma evitaba quedar bajo el agua cuando esta sube. Además, la riqueza de especies de plantas fue mayor allí (*Lonicera japonica*, *Ipomea indivisa*, *Amorpha fruticosa*, *Iris pseudacorus*, *Ligustrum sinense*, *Fumaria capreolata*, *Phytolacca americana*, *Morus nigra*, *Oxalis* sp., entre otras). Por otro lado, en el sitio A el agua es escasa debido a la modificación del terreno, y presentó cuatro nidos de hormigas, por lo tanto, la presión de forrajeo sobre las plantas de sauce fue más fuerte. La vegetación de crecimiento espontáneo fue menos diversa, e incluyó especies que no son seleccionadas normalmente por *A. ambiguus* (*Carduus acanthoides*, *Baccharis* sp., *Carex* sp.). Como consecuencia, las hormigas tuvieron en este sitio muchas menos opciones para cortar, produciendo más daño a los sauces. Es importante mencionar que, a pesar de estas diferencias en las características generales de los sitios, la estrategia *push-pull* fue exitosa en ambos campos, lo que fortalece su uso. En el sitio A, la escasa vegetación de crecimiento espontáneo se convirtió en una opción de corte para las hormigas, cuando encontraron los sauces con el estímulo *push*. En el sitio B, con una vegetación más diversa, sólo con el estímulo *pull* los resultados fueron muy buenos. Sin embargo, en el tratamiento *push-pull*, las plantas de sauce permanecieron casi intactas, y el uso de los dos estímulos simultáneos pareció sinergizar el efecto de cada uno por separado.

CONSIDERACIONES FINALES



La producción forestal de salicáceas en la zona del Bajo Delta del Paraná fue tradicionalmente llevada adelante por la unidad familiar en pequeñas superficies. Básicamente se plantaban álamos sobre los albardones y los sauces, que están más adaptados a la inundación, en los pajonales (Fracassi *et al.*, 2014). Por los procesos de fomento a la producción forestal en las últimas décadas, ésta se ha convertido en la actividad más importante de la zona, y casi en la única opción de subsistencia de los pobladores de las islas. Mientras tanto la emigración rural ha continuado en ascenso, en particular la migración de las mujeres jóvenes que cuentan con los medios para mudarse a la ciudad y continuar con sus estudios o buscar empleo (Camarero *et al.*, 2018).

Acompañando a las políticas que generaron la ampliación de la producción forestal en el Delta, otras agencias gubernamentales como el INTA o la Subsecretaría de Desarrollo Foresto Industrial (dependiente del Ministerio de Agroindustria), han destinado presupuesto para investigaciones y desarrollo de técnicas para mejorar los rindes de la producción (Camarero *et al.*, 2018). Estas inversiones han sido orientadas, en su mayoría, a las propiedades de gran tamaño y a la producción de monocultivos especializados (Borodowski, 2006), que perpetúan la modificación del ambiente para un uso intensivo del suelo, y la dependencia de insumos para controlar plagas que aparecen, justamente, como consecuencia de este tipo de práctica. Los pequeños productores no pueden competir con los grandes, son expulsados del territorio, y los que se quedan trabajando como empleados para las grandes empresas (que hoy son las que utilizan la mayor superficie del territorio para sus producciones), se ven directamente perjudicados por los agrotóxicos que son utilizados para el mantenimiento del monocultivo.

Para tratar de entender lo que está ocurriendo a nivel ecosistémico, de la mano con la cuestión social, quisiera volver a la definición de humedal proveniente del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable: *“un humedal es un ambiente en el cual la presencia temporaria o permanente de agua superficial o subsuperficial causa flujos biogeoquímicos propios y diferentes a los ambientes terrestres y acuáticos. Rasgos distintivos son la presencia de biota adaptada a estas condiciones, comúnmente plantas hidrófitas, y/o suelos hídricos o sustratos con rasgos de hidromorfismo”*. Esta definición pone de manifiesto que no es la fisonomía el carácter que define a los humedales (como en el caso de los ecosistemas de bosque o de pastizal) y, en cambio, apela a cuestiones funcionales (tales como régimen hidrológico, flujos biogeoquímicos) como carácter determinante de los mismos. Los endicamientos que generan “sistemas cerrados” con el objetivo de crear mayor superficie apta para la producción de

álamos, generan cambios en el régimen hidrológico del humedal que pueden llegar a ser irreversibles (Y. V. Sica *et al.*, 2016).

Un cambio tan grande en el ecosistema va a generar un desequilibrio en los procesos ecológicos característicos del lugar, ya que desde el ciclado de nutrientes, hasta las interacciones tróficas van a ser alteradas (Altieri & Nicholls, 2004). Aquí llegamos al problema: ¿por qué las hormigas son plaga? Entender esto fue clave para el diseño del manejo integrado presentado.

Las HCH son consideradas ingenieras del ecosistema⁸ (Montoya-Lerma *et al.*, 2012). Aumentan la fertilidad del suelo al incrementar la concentración de macronutrientes y mejoran la permeabilidad del suelo en los nidos; en las cámaras de desechos hay una mayor disponibilidad de nutrientes para las plantas; las plantas vecinas a los nidos tienen un mayor crecimiento por la disponibilidad directa de nutrientes (Farji-Brener & Werenkraut, 2015). Los nidos abandonados de HCH generan hábitats distintivos por los cambios generados en el suelo y por el aumento de la incidencia de luz al nivel del suelo, esto genera modificaciones en la dinámica de la vegetación que va a colonizar ese hábitat (Farji-Brener, 2005). Las HCH actúan como filtros ecológicos seleccionando especies de plantas de un conjunto disponible (Meyer *et al.*, 2006), y dispersan semillas de las especies que colectan y acarrean (Pikart *et al.*, 2010), esto genera una concentración de individuos de estas especies una vez que el nido está inactivo, o las semillas son descartadas.

A pesar de todos estos efectos importantes que generan las HCH en el ecosistema, cuando se presenta una situación productiva de la escala de una producción forestal, con un esquema de monocultivo (y en este caso, acompañada con una gran modificación de los regímenes hidrológicos), la homogeneización del paisaje genera que estos insectos pasen de tener un rol fundamental en el ecosistema a ser considerados plaga.

Teniendo en cuenta el tipo de producción forestal que se está llevando a cabo en la zona, la estrategia *push-pull* para manejar HCH aquí presentada, demostró que las hormigas, si bien seleccionan algunas plantas por sobre otras, no tienen una preferencia en particular por las salicáceas. La utilización del farnesol + la barrera mecánica para bloquear el ataque fue un excelente estímulo *push*. Y simultáneamente el uso de la vegetación de crecimiento espontáneo como estímulo *pull*, no solo proporcionó alternativas de corte, sino que también actuó enmascarando al cultivo. En caso de que

⁸ “Los ingenieros del ecosistema son organismos que, directa o indirectamente, modulan la disponibilidad de recursos para otras especies, causando cambios de estados físicos en materiales bióticos y abióticos. Al realizar esto, modifican, mantienen y crean hábitats” (Jones *et al.*, 1994).

hubiera alguna colonia que siguiera produciendo daño en la plantación, se puede utilizar el aceite esencial de naranja como herramienta atrayente para movilizar la plaga hacia otra opción de corte.

Esta estrategia está diseñada como una alternativa local, libre de tóxicos y ambientalmente segura para el manejo de HCH. El uso de la vegetación de crecimiento espontáneo como estímulo atrayente, además de brindar a las hormigas otras opciones de corte, contribuye a mantener y generar mayor biodiversidad en el sitio. Este aumento en la riqueza de especies vegetales conjuntamente con el cultivo, mejora las funciones del ecosistema, regenera las interacciones bióticas que producen servicios ecosistémicos, promueve la resiliencia de la producción y, en consecuencia, reduce la necesidad de insumos externos (Landis *et al.*, 2000; Isbell *et al.*, 2011, 2017; Kremen & Miles, 2012; Gurr *et al.*, 2017; Chaplin-Kramer, *et al.*, 2011).

Pensar las producciones forestales en el Delta con un rediseño predial que promueva la diversificación para optimizar los procesos claves del ecosistema podría ser un primer paso para que esta estrategia tenga posibilidades de ser utilizada en la práctica.

Tomando como referencia la exitosa aplicación de la estrategia *push-pull* para el maíz y el sorgo en África, el trabajo que habría que continuar a futuro para poder llevar a la práctica esta estrategia para HCH en plantaciones forestales, implicaría:

- Evaluar diferentes diseños de franjas de vegetación intercaladas con el cultivo. Las plantaciones forestales suelen utilizar cientos de hectáreas, podría evaluarse parcelas con diferentes separaciones entre el cultivo y la vegetación para conocer la superficie de vegetación necesaria para que las HCH no produzcan daños económicos a los productores (Khan *et al.*, 2009).
- Estudiar profundamente la ecología química que ocurre entre hormigas, cultivo y plantas alternativas de corte, y cómo esta interacción puede afectar a otros organismos, como por ejemplo enemigos naturales (Khan *et al.*, 2008 a, 2010; Midega *et al.*, 2009).
- Medir el impacto de esta estrategia en otros artrópodos (Midega *et al.*, 2008, 2009, 2014 a).
- Estudiar si la implementación de esta estrategia genera beneficios económicos a los productores a corto, mediano o largo plazo, y modificar lo necesario para cumplir con este objetivo (Khan *et al.*, 2008 b, 2014; Midega *et al.*, 2014 b; Chepchirchir *et al.*, 2018).
- Trabajar en la adopción de la estrategia con los productores. Que sean parte de la estrategia de implementación, aportando conocimiento local y discutiendo a la par de los investigadores las ideas de diseño dentro de la producción, es la única manera de llevar exitosamente a la práctica cualquier forma de manejo (Amudavi *et al.*, 2009; Murage *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2014).

Por último, quisiera reflexionar sobre la necesidad de estudiar la situación del Bajo Delta como un socio-ecosistema, y no como dos sistemas independientes (el sistema ecológico por un lado, y el social por otro), ya que en un sistema productivo ambos están inevitablemente relacionados. La situación actual en la que se encuentra esta zona representa un ejemplo de más de la mitad de los ecosistemas naturales de la Tierra, que han sido modificados por actividades humanas para la provisión de bienes ecosistémicos (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Las características emergentes de este tipo de sistemas son su vulnerabilidad y resiliencia (Easdale *et al.*, 2018). Para comprender la vulnerabilidad de un socio-ecosistema es clave estudiar el nivel de exposición del sistema frente a las amenazas (asociado a la dinámica de los disturbios), las características sociales y ecológicas del sistema que determinan su sensibilidad a ser afectado por una o más amenazas a diferentes escalas, y la resiliencia socio-ecológica (Turner II *et al.*, 2003; Easdale *et al.*, 2018). La resiliencia, en un sistema socio-ecológico, se define como la capacidad de respuesta del sistema frente a disturbios, aprender a reorganizarse, ajustarse y adaptarse luego del mismo, evitando cruzar umbrales hacia estados alternativos no deseables o potencialmente irreversibles (Folke, 2006; Domptail *et al.*, 2013; López *et al.*, 2017; Easdale *et al.*, 2018). En el caso de las producciones forestales en el Delta, las mismas se propusieron, en un principio, como una posibilidad de detener el despoblamiento de las islas, dándole a los habitantes una opción de subsistencia. Pero no se tuvo en cuenta el sistema ecológico del humedal con sus disturbios frecuentes de inundación propios de ese ecosistema, y la vulnerabilidad que esto generaba a este tipo de producciones. La respuesta a este disturbio fue modificar el ambiente, hacerlo dependiente de intervención humana para poder generar una ganancia monetaria (con las diferencias sociales que este tipo de intervención implica y mencioné anteriormente). Esto no solucionó el problema, ya que, esta modificación trajo los inconvenientes que genera cualquier modificación de tal envergadura, por ejemplo, en el marco de esta tesis, poblaciones crecientes de HCH que se transformaron en plaga. Por otra parte, las personas continuaron yéndose de las islas.

La diversificación de la producción parecería ser el desarrollo territorial más adecuado, pero para que se lleve a cabo con éxito en la práctica debe ser un trabajo consensuado transdisciplinariamente (Chambers, 1994; Raymond *et al.*, 2010; Morton *et al.*, 2015; Easdale *et al.*, 2017; Easdale & Aguiar, 2018). La elección de qué producciones realizar y cómo, debe ser un proyecto discutido en conjunto con todos los actores involucrados: con investigadores de varias áreas, extensionistas, pobladores y tomadores de decisiones.



BIBLIOGRAFIA



- Al-Badran, A.A., Fujiwara, M., Gatlin, D.M., Mora, M.A., 2018. Lethal and sub-lethal effects of the insecticide fipronil on juvenile brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus*. *Sci. Rep.* 8, 28–31. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29104-3>
- Almeida, J.T.S. de, Medici, L.O., Aguiar-Menezes, E.D.L., 2013. Eficiência e princípio de funcionamento de barreira física cônica contra as quenquéns. *FLORESTA* 43, 633–642.
- Altieri, M.A., Letourneau, D.K., 1982. Vegetation management and biological control in agroecosystems. *Crop Prot.* 1, 405–430. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(82\)90023-0](https://doi.org/10.1016/0261-2194(82)90023-0)
- Altieri, M.A., Nicholls, C., 2004. Optimizando el manejo agroecológico de plagas a través de la salud del suelo. *Agroecología* 29–36.
- Aluja, M., Boller, E.F., 1992. Host marking pheromone of *Rhagoletis cerasi*: field deployment of synthetic pheromone as a novel cherry fruit fly management strategy. *Entomol. Exp. Appl.* 65, 141–147. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1992.tb01637.x>
- Amudavi, D., Khan, Z., Wanyama, J., 2009. Assessment of technical efficiency of farmer teachers in the uptake and dissemination of push–pull technology in Western Kenya. *Crop Prot.* 28, 987–996. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.04.010>
- Bartoń, K., 2019. MuMIn: Multi-model inference. R package version 1.15.6. Version 1, 18. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/MuMIn/MuMIn.pdf>
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S, 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48.
- Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L., 2006. *Ecology From Individuals to Ecosystems*, Fourth edi. ed. Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom.
- Bernays, E., Chapman, R.F., 1994. *Host Plant Selection by Phytophagous Insects*. Chapman & Hall, New York, United States.
- Bigi, M.F., Torkomian, V.L., De Groot, S.T., Hebling, M.J., Bueno, O.C., Pagnocca, F.C., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., Da Silva, M.F.G.F., 2004. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Pest Manag. Sci.* 60, 933–938.
- Bó, R., Quintana, R., 2017. Subregión Ríos, esteros, bañados y lagunas del río Paraná, en: Benzaquen, L., Blanco, D.E., Bo, R., Kandus, P., Lingua, G., Minotti, P., Quintana, R (Eds.), *Regiones de Humedales de La Argentina*. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Fundación Humedales/Wetlands International, Universidad Nacional de San Martín y Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, pp. 113–133.
- Bollazzi, M., Kronenbitter, J., Roces, F., 2008. Soil temperature, digging behaviour, and the adaptive value of nest depth in South American species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Oecologia* 158, 165–175. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1113-z>

- Bollazzi, M., Roces, F., 2011. Information needs at the beginning of foraging: Grass-cutting ants trade off load size for a faster return to the nest. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017667>
- Bonfils, C., 1962. Los suelos del Delta del Río Paraná. Factores generadores, Clasificación y Uso. *Rev. Invest. Agric.* 26, 257–340.
- Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 35–67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- Borden, J.H., Birmingham, A.L., Burleigh, J.S., 2006. Evaluation of the push-pull tactic against the mountain pine beetle using verbenone and non-host volatiles in combination with pheromone-baited trees. *For. Chron.* 82, 579–590. <https://doi.org/10.5558/tfc82579-4>
- Borodowski, E.D., 2006. Alamos y sauces en el Delta del Paraná: situación del sector y silvicultura. *Actas Jornadas de Salicáceas* 61–70.
- Borodowski, E., 2011. Estado de situación del cultivo de sauce en el Delta del Paraná., en: *Jornada Técnica Sobre El Sauce En El Delta Entrerriano*.
- Borodowski, E.D., 2017. Situación actual del cultivo y uso de las Salicáceas en Argentina, en: *V Congreso Internacional de Salicáceas 2017*. Buenos Aires.
- Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., Silva, O.A., Matenhauer, A.M.C., 1995. Effect of sesame (*Sesamum indicum* L) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entomol.* 119, 341–343. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1995.tb01297.x>
- Caffarini, P., Carrizo, P., Pelicano, A., 2006. Extractos cítricos como atrayentes para cebos hormiguicidas con sustancias naturales. *Rev. la Fac. Ciencias Agrar.* XXXVIII, 19–26.
- Caffarini, P., Carrizo, P., Pelicano, A., Roggero, P., Pacheco, J., 2008. Efectos de extractos acetónicos y acuosos de *Ricinus communis* (Ricino), *Melia azedarach* (Paraíso) Y *Trichillia glauca* (Trichillia), sobre la hormiga negra común (*Acromyrmex lundii*
- Camarero, G., Straccia, P.H., Maestriepieri, E., Ortiz, D., Liftenegger, A., 2018. Mapa social de los agentes de la Zona Núcleo Forestal del Delta Inferior del río Paraná, en: Benencia, R., Pizarro, C. (Eds.), *Ruralidades, Actividades Económicas y Mercados de Trabajo En El Delta Vecino a La Región Metropolitana de Buenos Aires*. CICCUS, Buenos Aires.
- Carlos, A.A., Forti, L.C., Camargo, R.S., Verza, S.S., Barbosa, L., Lopes, J.F.S., 2010. Behavioral response of the leafcutter ant, *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae), to components of citrus pulp. *Sociobiology* 55, 509–518.
- Castaño-Quintana, K., Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., 2013. Toxicity of foliage extracts of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) workers. *Ind. Crops Prod.* 44, 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.039>
- Chambers, R., 1994. The Origins and Practice of Participatory Appraisal. *World Development* 22, 953–969.

- Chaplin-Kramer, Rebecca O'Rourke, M.E., Blitzer, E.J., Kremen, C., 2011. A meta-analysis of crop pest and natural enemy response to landscape complexity. *Ecol. Lett.* 14, 922–932. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01642.x>
- Chepchirchir, R.T., Macharia, I., Murage, A.W., Midega, C.A.O., Khan, Z.R., 2018. Ex-post economic analysis of push-pull technology in Eastern Uganda. *Crop Prot.* 112, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.07.001>
- Cherrett, J.M., 1972. Some Factors Involved in the Selection of Vegetable Substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in Tropical Rain Forest. *J. Anim. Ecol.* 41, 647. <https://doi.org/10.2307/3200>
- Cook, S.M., Khan, Z.R., Pickett, J. a, 2007. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 375–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091407>
- De Vries, H., 1995. An improved test of linearity in dominance hierarchies containing unknown or tied relationships. *Anim. Behav.* 50, 1375–1389.
- Della Lucia, T.M., Gandra, L.C., Guedes, R.N., 2014. Managing leaf-cutting ants: Peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag. Sci.* 70, 14–23. <https://doi.org/10.1002/ps.3660>
- Dent, D. 1993. *Insect Pest Management*. CAB International, Wallingford, UK: 604 p.
- Dhaliwal, G.S., Koul, O., Arora, R., 2004. Integrated Pest Management: Retrospect and Prospect, en: Koul, O., Dhaliwal, G.S., Cuperus, G.W. (Eds.), *Integrated Pest Management. Potential, Constraints and Challenges*. CABI Publishing, Cambridge, pp. 1–20.
- Domptail, S., Easdale, M.H., Yuerlita, 2013. Managing Socio-Ecological Systems to Achieve Sustainability: A Study of Resilience and Robustness. *Environ. Policy Gov.* 45, 30–45. <https://doi.org/10.1002/eet.1604>
- dos Santos, C.J., Zanetti, R., Ferreira De Oliveira, D., 2013. Plant – Derived Products for Leaf – Cutting Ants Control, en: *Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies Solvent*. INTECH, pp. 259–295.
- Duraimurug, P., Regupathy, A., 2005. Push-pull Strategy with Trap Crops, Neem and Nuclear Polyhedrosis Virus for Insecticide Resistance Management in *Helicoverpa armigera* (Hubner) in Cotton. *Am. J. Appl. Sci.* 2, 1042–1048. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2005.1042.1048>
- Easdale, M., Conti, S., Nuñez, P.G., 2017. El desafío de integrar investigación y extensión rural en procesos de innovación tecnológica orientados al desarrollo territorial. *Rev. la Fac. Agron. La Plata* 116, 51–60.
- Easdale, M.H., Aguiar, M.R., 2018. From traditional knowledge to novel adaptations of transhumant pastoralists the in face of new challenges in North Patagonia. *J. Rural Stud.* 63, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2018.09.001>
- Easdale, M.H., López, D.R., Aguiar, M.R., 2018. Tensiones entre conservación de ecosistemas y desarrollo territorial: hacia un abordaje socioecológico en las Ciencias Agropecuarias. *Cuad. Desarro. Rural* 15, 26–45.

- Eigenbrode, S.D., Birch, A.N.E., Lindzey, S., Meadow, R., Snyder, W.E., 2016. A mechanistic framework to improve understanding and applications of push-pull systems in pest management. *J. Appl. Ecol.* 53, 202–212. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12556>
- Farji Brener A.G., Ruggiero A., 1994. Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patterns in species richness and geographical range sizes. *J. Biogeogr.* 21, 391–399.
- Farji-Brener, A.G., 2005. The effect of abandoned leaf-cutting ant nest on plant assemblage composition in a tropical rainforest of Costa Rica. *Ecoscience* 12, 554–560.
- Farji-Brener, A.G., Werenkraut, V., 2015. A meta-analysis of leaf-cutting ant nest effects on soil fertility and plant performance. *Ecol. Entomol.* 40, 150–158. <https://doi.org/10.1111/een.12169>
- Folke, C., 2006. Resilience: The emergence of a perspective for social-ecological systems analyses. *Glob. Environ. Chang.* 16, 253–267. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2006.04.002>
- Fracassi, N., Quintana, R.D., Pereira, J., Mujica, G., Roberto, L., 2013. Protocolo de estrategias de conservación de la biodiversidad en bosques plantados de salicáceas del Bajo Delta del Paraná, 1a ed. Ediciones INTA.
- Fracassi, N.G., Gonzalez, A., Mujica, G., 2014. Conservación de la biodiversidad en plantaciones forestales de salicáceas del Bajo Delta. Desafíos y estrategias de gestión, en: Athor, J. (Ed.), *El Delta Bonaerense - Naturaleza, Conservación y Patrimonio Cultural*. Fundación Félix de Azara, Buenos Aires, pp. 301–313.
- Fracassi, N.G., Pereira, J.A., Mujica, G., Hauri, B., Quintana, R.D., 2017. Estrategias de conservación de la Biodiversidad en Paisajes Forestales del bajo Delta del Paraná- uniendo actores claves de la región. *Mastozoología Neotrop.* 24, 59–68.
- Gammell, M.P., De Vries, H., Jennings, D.J., Carlin, C.M., Hayden, T.J., 2003. David's score: a more appropriate dominance ranking method than Clutton-Brock *et al.*'s index. *Anim. Behav.* 66, 601–605. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2226>
- Gardner, R.C., Barchiesi, S., Beltrame, C., Finlayson, C.M., Galewski, T., Harrison, I., Paganini, M., Perennou, C., Pritchard, D., Rosenqvist, A., Walpole, M., 2015. State of the World's Wetlands and Their Services to People: A Compilation of Recent Analyses. *SSRN Electron. J.* <https://doi.org/10.2139/ssrn.2589447>
- Geier, P.W., Clark, L.R., 1961. An ecological approach to pest control., en: *Proceedings of the Eighth Technical Meeting. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Warsaw, Poland*, pp. 10–18.
- Giesel, A., Carissimi Boff, M.I., Boff, P., 2012. The effect of homeopathic preparations on the activity level of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Acta Sci. Agron.* 34, 445–451. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v34i4.14418>
- Gillette, N.E., Mehmel, C.J., Mori, S.R., Webster, J.N., Wood, D.L., Erbilgin, N., Owen, D.R., 2012. The push-pull tactic for mitigation of mountain pine beetle (Coleoptera: Curculionidae) damage in lodgepole and whitebark pines. *Environ. Entomol.* 41, 1575–86. <https://doi.org/10.1603/EN11315>
- Giraldo, C., 2005. Efecto del botón de oro *Tithonia diversifolia* sobre la herbivoría de hormiga arriera *Atta cephalotes* en una plantación de arboloco *Montanoa quadrangularis*. Tesis Doctoral. Universidad de Antioquia, Colombia.

- Goncalves, C.B., 1944. O gergelim e a sauva. Bol. Fitoss 1, 19–27.
- Grace, M.H., 2002. Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*. Phytother. Res. 16, 183–5. <https://doi.org/10.1002/ptr.872>
- Guerin, P.M., Städler, E., 1982. Host odour perception in three phytophagous Diptera - A comparative study, en: Visser, J.H., Minks, A.K. (Eds.), 5th International Symposium on Insect-Plant Relationships. Wageningen, Pudoc, pp. 95–105.
- Guerrero Rincón, N., Olarte Quintero, M.A., Pérez Naranjo, J.C., 2012. Leaf Area Measurement in Photographs Taken with a Webcam , a Cell Phone or a Semi Professional Camera. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín 65, 6399–6405.
- Gurr, G.M., Wratten, S.D., Landis, D.A., You, M., 2017. Habitat Management to Suppress Pest Populations: Progress and Prospects. Annu. Rev. Entomol. 62, 91–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035050>
- Hernandez, M.M., Sanz, I., Adelantado, M., Ballach, S., Primo, E., 1996. Electroantennogram activity from antennae of *Ceratitis capitata* (Wied) to fresh orange airborne volatiles. J. Chem. Ecol. 22, 1607–1619.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 2009. The Super-Organism, First Edit. ed. Norton & Company, New York, United States.
- Howard, J.J., 1987. Leafcutting Ant Diet Selection: The Role of Nutrients, Water, and Secondary Chemistry. Ecology 68, 503–515.
- Howard, J.J., Cazin, J.J., Wiemer, D.F., 1988. Toxicity of terpenoid deterrent to the leafcutting ant *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. J. Chem. Ecol. 14, 59–69.
- Howard, J.J., 1990. Infidelity of leafcutting ants to host plants: resource heterogeneity or defense induction?. Oecologia 82, 394–401.
- Hubbell, S.P., Wiemer, D.F., Adejare, A., 1983. An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (Hymenaea) against attack by fungus-growing ants (*Atta* spp.). Oecologia 60, 321–327. <https://doi.org/10.1007/BF00376846>
- INTA, Delta del Paraná. 1973. Estudio preliminar para el diagnóstico regional del Delta”. Rev. Delta del Paraná, 13(14).
- Isbell, F., Calcagno, V., Hector, A., Connolly, J., Harpole, W.S., Reich, P.B., Scherer-lorenzen, M., Schmid, B., Tilman, D., Ruijven, J. Van, Weigelt, A., Wilsey, B.J., Zavaleta, E.S., Loreau, M., 2011. High plant diversity is needed to maintain ecosystem services. Nature 477, 199–203. <https://doi.org/10.1038/nature10282>
- Isbell, F., Adler, P.R., Eisenhauer, N., Fornara, D., Kimmel, K., Kremen, C., Letourneau, D.K., Liebman, M., Polley, H.W., Quijas, S., Scherer-Lorenzend, M., 2017. Benefits of increasing plant diversity in sustainable agroecosystems. J. Ecol. 105, 871–879. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12789>
- Jimenez, N.L., 2019. Patrones de herbivoría y coocurrencia de hormigas cortadoras de hojas en forestaciones y áreas naturales del Bajo Delta del Río Paraná, Argentina. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.

- Jiménez, N.L., Fosco, I.R., Nassar, G.C., Sánchez-Restrepo, A.F., Danna, M.S., Calcaterra, L.A., 2020. Economic Injury Level and Economic Threshold as required by Forest Stewardship Council for management of leaf-cutting ants in forest plantations. *Agric. For. Entomol.* <https://doi.org/10.1111/afe.12409>
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373–386.
- Kalesnik, F., Quintana, R., 2006. El Delta del Rio Paraná como un mosaico de humedales. Caso de estudio: La reserva de biosfera MAB-UNESCO “Delta del Paraná.” *Geociencias* 5, 22–37.
- Khan, Z.R., Midega, C.A.O., Hutter, N.J., Wilkins, R.M., Wadhams, L.J., 2006. Assessment of the potential of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) varieties as trap plants for management of *Chilo partellus*. *Entomol. Exp. Appl.* 119, 15–22. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00393.x>
- Khan, Z., James, D., Midega, C., Pickett, J., 2008 a. Chemical ecology and conservation biological control. *Biol. Control* 45, 210–224. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.11.009>
- Khan, Z.R., Midega, C. a O., Njuguna, E.M., Amudavi, D.M., Wanyama, J.M., Pickett, J. a., 2008 b. Economic performance of the “push-pull” technology for stemborer and *Striga* control in smallholder farming systems in western Kenya. *Crop Prot.* 27, 1084–1097. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.01.005>
- Khan, Z.R., Midega, C. a O., Wanyama, J.M., Amudavi, D.M., Hassanali, A., Pittchar, J., Pickett, J. a., 2009. Integration of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.) into the push-pull technology developed for stemborer and *Striga* control in maize-based cropping systems. *Crop Prot.* 28, 997–1006. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.05.014>
- Khan, Z.R., Midega, C. a O., Bruce, T.J. a, Hooper, A.M., Pickett, J. a., 2010. Exploiting phytochemicals for developing a “push-pull” crop protection strategy for cereal farmers in Africa. *J. Exp. Bot.* 61, 4185–4196. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq229>
- Khan, Z.R., Midega, C.A.O., Pittchar, J.O., Murage, A.W., Birkett, M.A., Bruce, J.A., Pickett, J.A., B, P.T.R.S., Bruce, T.J.A., 2014. Achieving food security for one million sub-Saharan African poor through push – pull innovation by 2020. *Philos. Trans. R. Soc. B* 369.
- Kogan, M., 1998. Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 243–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.243>
- Kremen, C., Miles, A., 2012. Ecosystem Services in Biologically Diversified versus Conventional Farming Systems: Benefits , Externalities , and Trade-Offs. *Ecol. Soc.* 17, :40.
- Landau, H.G., 1951. On dominance relations and the structure of animal societies: I. Effect of inherent characteristics. *Bull. Math. Biophys.* 13, 1–19. <https://doi.org/10.1007/BF02478336>
- Landis, D.A., Wratten, S.D., Gurr, G.M., 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 175–201.
- Letourneau, D.K., Armbrecht, I., Salguero Rivera, B., Montoya Lerma, J., Jimenez Carmona, E., Daza, M.C., Escobar, S., Galindo, V., Gutierrez, C., Duque Lopez, S., Lopez Mejia, J., Acosta Rangel, A.M., Herrera Rangel, J., Rivera, L., Saavedra, C.A., Torres, A.M., Reyes Trujillo, A., 2011. Does plant diversity benefit agroecosystems? A synthetic review. *Ecol. Appl.* 21, 9–21.

- Lima, C. a, Della Lucia, T.M.C., Guedes, R.N.C., da Veiga, C.E., 2003. Desenvolvimento de iscas granuladas com atraentes alternativos para *Atta bisphaerica* Forel, (Hymenoptera: Formicidae) e sua aceitação pelas operárias. *Neotrop. Entomol.* 32, 497–501.
- Lindgren, B.S., Borden, J.H., 1993. Displacement and aggregation of mountain pine beetles, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae), in response to their antiaggregation and aggregation pheromones. *Can. J. For. Res.* 23, 286–290.
- Littleddyke, M., Cherrett, J.M., 1976. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (reich) (Formicidae, Attini). *Bull. Entomol. Res.* 66, 205–217. <https://doi.org/10.1017/S0007485300006647>
- Littleddyke, M., Cherrett, J.M., 1978. Olfactory responses of the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae) in the laboratory. *Bull. Entomol. Res.* 68, 273–282. <https://doi.org/10.1017/S0007485300007355>
- Löfstedt Gilljam, J., Leonel, J., Cousins, I.T., Benskin, J.P., 2016. Is Ongoing Sulfluramid Use in South America a Significant Source of Perfluorooctanesulfonate (PFOS)? Production Inventories, Environmental Fate, and Local Occurrence. *Environ. Sci. Technol.* 50, 653–659. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04544>
- López, D.R., Cavallero, L., Easdale, M.H., Carranza, C.H., Ledesma, M., Peri, P.L., 2017. Resilience Management at the Landscape Level: An Approach to Tackling Social- Ecological Vulnerability of Agroforestry Systems, en: F, M. (Ed.), *Integrating Landscapes: Agroforestry for Biodiversity Conservation and Food Sovereignty*. *Advances in Agroforestry*, Vol 12. Springer, Cham, Buenos Aires, pp. 127–148. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-69371-2_5
- Mace, G.M., Norris, K., Fitter, A.H., 2012. Biodiversity and ecosystem services: a multilayered relationship. *Trends Ecol. Evol.* 27, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.08.006>
- Malvárez, A., 1999. El delta del río Paraná como mosaico de humedales, en: Malvárez, A.. (Ed.), *Tópicos Sobre Humedales Subtropicales y Templados de Sudamérica*. MAB-ORCYT, Montevideo, pp. 35–53.
- Medeiros, J.R., Campos, L.B., Mendonça, S.C., Davin, L.B., Lewis, N.G., 2003. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry* 64, 561–565. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00338-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00338-8)
- Meyer, S.T., Roces, F., Wirth, R., 2006. Selecting the drought stressed: Effects of plant stress on intraspecific and within-plant herbivory patterns of the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Funct. Ecol.* 20, 973–981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01178.x>
- Midega, C.A.O., Khan, Z.R., van den Berg, J., Ogol, C.K.P.O., Dippenaar-Schoeman, A.S., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., 2008. Response of ground-dwelling arthropods to a ‘push–pull’ habitat management system: spiders as an indicator group. *J. Appl. Entomol.* 132, 248–254. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2007.01260.x>
- Midega, C. A. O., Khan, Z.R., Van den Berg, J., Ogol, C.K.P.O., Bruce, T.J., Pickett, J. a., 2009. Non-target effects of the “push–pull” habitat management strategy: Parasitoid activity and soil fauna abundance. *Crop Prot.* 28, 1045–1051. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.08.005>

- Midega, C. A. O., Pittchar, J., Salifu, D., Pickett, J. a., Khan, Z.R., 2013. Effects of mulching, N-fertilization and intercropping with *Desmodium uncinatum* on *Striga hermonthica* infestation in maize. *Crop Prot.* 44, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.10.018>
- Midega, C. A.O., Jonsson, M., Khan, Z.R., Ekbom, B., 2014 a. Effects of landscape complexity and habitat management on stemborer colonization, parasitism and damage to maize. *Agric. Ecosyst. Environ.* 188, 289–293. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.02.028>
- Midega, C.O., Salifu, D., Bruce, T.J., Pittchar, J., Pickett, J. a., Khan, Z.R., 2014 b. Cumulative effects and economic benefits of intercropping maize with food legumes on *Striga hermonthica* infestation. *F. Crop. Res.* 155, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.09.012>
- Miller, J.R. & C.R., Cowles, R.S., 1990. Stimulo-deterrent diversion: A concept and its possible application to onion maggot control. *J. Chem. Ecol.* 16, 3197–212. <https://doi.org/10.1007/BF00979619>
- Minotti, P.G., Kandus, P., 2013. Actualización y profundización del mapa de endicamientos y terraplenes de la región del Delta del Paraná - 2013. Informe y Mapa elaborados para Wetland International LAC. Buenos Aires.
- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., Calle, Z., 2012. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *Int. J. Pest Manag.* 58, 225–247. <https://doi.org/10.1080/09670874.2012.663946>
- Morais, W.C.C., Lima, M.A.P., Zanuncio, J.C., Oliveira, M.A., Bragança, M.A.L., Serrão, J.E., Lucia, T.M.C. Della, 2015. Extracts of *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum* and *Mentha piperita* inhibit the growth of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Ind. Crops Prod.* 65, 463–466. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.054>
- Morton, L.W., Eigenbrode, S.D., Martin, T.A., 2015. Architectures of adaptive integration in large collaborative projects. *Ecol. Soc.* 20, 5.
- Mudd, A., Peregrine, D.J., Cherrett, J.M., 1978. The chemical basis for the use of citrus pulp as a fungus garden substrate by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). *Bull. Entomol. Res.* 68, 673–685. <https://doi.org/10.1017/S0007485300009639>
- Mueller, U.G., Rehner, S.A., Schultz, T.R., 1998. The evolution of agriculture in ants. *Science* (80) 281, 2034–2038. <https://doi.org/10.1126/science.281.5385.2034>
- Murage, A.W., Obare, G., Chianu, J., Amudavi, D.M., Pickett, J., Khan, Z.R., 2011. Duration analysis of technology adoption effects of dissemination pathways: A case of “push-pull” technology for control of *Striga* weeds and stemborers in Western Kenya. *Crop Prot.* 30, 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.11.009>
- Naciones Unidas, 1992. Convenio sobre la Diversidad Biológica.
- Obeysekara, P.T., Legrand, A., Lavigne, G., 2014. Use of herbivore-induced plant volatiles as search cues by *Tiphia vernalis* and *Tiphia popilliavora* to locate their below-ground scarabaeid hosts. *Entomol. Exp. Appl.* 150, 74–85. <https://doi.org/10.1111/eea.12138>
- Ogot, N.O., Pittchar, J.O., Midega, C.A.O., Khan, Z.R., 2018. Attributes of push-pull technology in enhancing food and nutrition security. *African J. Agric. Food Secur.* 6, 229–242.

- Okunade, A.L., Wiemer, D.F., 1985. Ant-repellent sesquiterpene lactones from *Eupatorium quadrangularae*. *Phytochemistry* 24, 1199–1202. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81100-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81100-0)
- Palacios, F., Gladstone, S., 2003. Eficacia del farnesol y de un extracto de semilla de ayote como repelentes de *Atta mexicana*. *Manejo Integr. Plagas y Agroecol.* 68, 89–91.
- Paredes, C., Iannacone, J., Alvaríño, L., 2019. Efecto subletal del fipronil en el desenvolvimiento de embriones de *Oncorhynchus mykiss* “trucha arco iris.” *Biotempo* 10, 9–14. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v10i0.848>
- Peden-Adams, M.M., EuDaly, J.G., Dabra, S., EuDaly, A., Heesemann, L., Smythe, J., Keil, D.E., 2007. Suppression of humoral immunity following exposure to the perfluorinated insecticide sulfluramid. *J. Toxicol. Environ. Health* 70, 1130–1141. <https://doi.org/10.1080/15287390701252733>
- Pérez, S.P., Corley, J.C., Farji-Brener, A.G., 2011. Potential impact of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* on conifer plantations in northern Patagonia, Argentina. *Agric. For. Entomol.* 13, 191–196. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2010.00515.x>
- Perri, D., Gorosito, N., Fernández, P., Buteler, M., 2017. Plant-based compounds with potential as push-pull stimuli to manage behavior of leaf-cutting ants. *Entomol. Exp. Appl.* 163, 150–159. <https://doi.org/10.1111/eea.12574>
- Perri, D. V., Gorosito, N.B., Schilman, P.E., Casaubón, E.A., Dávila, C., Fernández, P.C., 2020. Push-pull to manage leaf-cutting ants: an effective strategy in forestry plantations. *Pest Manag. Sci.* <https://doi.org/10.1002/ps.6036>
- Pickett, J. a, Woodcock, C.M., Midega, C. a O., Khan, Z.R., 2014. Push-pull farming systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 125–32. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.006>
- Pikart, T.G., Souza, G.K., Zanuncio, T.V., Zanetti, R., Polanczyk, Ricardo Antonio Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., 2010. Dispersion of Seeds of Tree Species by the Leaf-Cutting Ant *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera : Formicidae) in Viçosa , Minas Gerais State , Brazil. *Sociobiology* 56, 645–652.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team (2019). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-140,
- Pyke, B., Rice, M., Sabine, B., Zalucki, M., 1987. The push–pull strategy behavioural control of *Heliothis*. *Aust. Cott. Grow.* 4, 7–9.
- Qiao, Y., Xie, B.J., Zhang, Yan, Zhang, Yun, Fan, G., Yao, X.L., Pan, S.Y., 2008. Characterization of aroma active compounds in fruit juice and peel oil of Jincheng sweet orange fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. *Molecules* 13, 1333–1344. <https://doi.org/10.3390/molecules13061333>
- R Core Team, R, 2019. A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Disponible en: <https://www.rproject.org/>, Vienna, Austria.
- Raymond, C.M., Fazey, I., Reed, M.S., Stringer, L.C., Robinson, G.M., Evely, A.C., 2010. Integrating local and scientific knowledge for environmental management. *J. Environ. Manage.* 91, 1766–1777. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.03.023>

- Roces, F., Núñez, J.A., 1993. Information about food quality influences load-size selection in recruited leaf-cutting ants. *Anim. Behav.* 45, 135–143.
- Roces, F., Kleineidam, C., 2000. Humidity preference for fungus culturing by workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Insectes Soc.* 47, 348–350. <https://doi.org/10.1007/PL00001728>
- Rockwood, L., 1977. Foraging Patterns and Plant Selection in Costa Rican Leaf Cutting Ants. *J. New York Entomol. Soc.* 85, 222–233.
- Rodríguez, J., Montoya-Lerma, J., Calle, Z., 2015. Effect of *Tithonia diversifolia* mulch on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) nests. *J. Insect Sci.* 15, 1–7. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev015>
- Sánchez-Restrepo, A.F., Jiménez, N.L., Confalonieri, V.A., Calcaterra, L., 2019. Distribution and diversity of leaf-cutting ants in Northeastern Argentina: species most associated with forest plantations. *Int. J. Pest Manag.* 1–14. <https://doi.org/10.1080/09670874.2018.1555343>
- Santos-Oliveira, M.F.S., Bueno, O.C., Marini, T., Reiss, I.C., Bueno, F.C., 2006. Toxicity of *Azadirachta indica* to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 47, 423–431.
- Saverschek, N., Herz, H., Wagner, M., Roces, F., 2010. Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus: learning and long-term memory in leaf-cutting ants. *Anim. Behav.* 79, 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.12.021>
- Saverschek, N., Roces, F., 2011. Foraging leafcutter ants: Olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Anim. Behav.* 82, 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.05.015>
- Schildknecht, H., 1976. Chemical ecology: a chapter of modern natural products chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 151, 214–222.
- Schoonhoven, L.M., Jermy, T., Van Loon, J.J.A., 1998. *Insect-Plant Biology: From Physiology to Evolution*. Chapman & Hall, London.
- Schooven, L.M., van Loon, J.J.A., Dicke, M., 2005. Host-plant selection: how to find a host plant, en: *Insect-Plant Biology*. Oxford University Press, New York, United States, pp. 135–160.
- Schröder, R., Hilker, M., 2008. The Relevance of Background Odor in Resource Location by Insects: A Behavioral Approach. *Bioscience* 58, 308–316. <https://doi.org/10.1641/B580406>
- Shackleton, C.M., Ruwanda, S., Sinasson Sanni, G.K., Bennett, S., De Lacy, P., Modipa, R., Mtati, N., Sachikonye, M., Thondhlana, G., 2016. Unpacking Pandora’s Box: Understanding and Categorising Ecosystem Disservices for Environmental Management and Human Wellbeing. *Ecosystems* 19, 587–600. <https://doi.org/10.1007/s10021-015-9952-z>
- Shorey, H.H., Gaston, L.K., Gerber, R.G., Phillips, P.A., Wood, D.L., 1992. Disruption of foraging by argentine ants, *Iridomyrmex humilis* (Mayr) (Hymenoptera: Formicidae), in citrus trees through the use of semiochemicals and related chemicals. *J. Chem. Ecol.* 18, 2131–2142. <https://doi.org/10.1007/BF00981933>
- Shorey, H., Gaston, L., Gerber, R., Sisk, C., Phillips, P., 1996. Formulating Farnesol and Other Ant-Repellent Semiochemicals for Exclusion of Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae) from Citrus Trees. *Physiol. Chem. Ecol.* 25, 114–119.

- Sica, Y. V., Quintana, R.D., Radeloff, V.C., Gavier-pizarro, G.I., 2016. Wetland loss due to land use change in the Lower Paraná River Delta, Argentina. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.200>
- Souza, A., Zanetti, R., Calegario, N., 2011. Nível de Dano Econômico para Formigas-Cortadeiras em Função do Índice de Produtividade Florestal de Eucaliptais em uma Região de Mata Atlântica. *Neotrop. Entomol.* 40, 483–488.
- Stern, V.M., Smith, R.F., van den Bosch, R., Hagen, K.S., 1959. The integration of chemical and biological control of the spotted lucerne aphid. The integrated control concept. *Hilgardia* 29, 81–101.
- Talukder, F.A., Howse, P.E., 1994. Repellent, toxic, and food protectant effects of pithraj, *Aphanamixis polystachya* extracts against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* in storage. *J. Chem. Ecol.* 20, 899–908.
- Tingle, C.C., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, D., King, W., 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environmental Contam. Toxicol.* 176, 1–66.
- Travaglini, R. V., Forti, L.C., Camargo, R.S., 2015. Foraging behavior of leaf cutting ants: How do workers search for their food?. *Sociobiology* 62, 347–350. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i3.714>
- Turner II, B.L., Kasperson, R.E., Matson, P.A., Mccarthy, J.J., Corell, R.W., Christensen, L., Eckley, N., Kasperson, J.X., Luers, A., Martello, M.L., Polsky, C., Pulsipher, A., Schiller, A., 2003. A framework for vulnerability analysis in sustainability science. *PNAS* 100, 8074–8079.
- Valderrama-Eslava, E.I., Montoya-Lerma, J., Giraldo, C., 2009. Enforced herbivory on *Canavalia ensiformis* and *Tithonia diversifolia* and its effects on leaf-cutting ants, *Atta cephalotes*. *J. Appl. Entomol.* 689–694. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01421.x>
- Van den Berg, J., Van Hamburg, H., 2015. Trap cropping with Napier grass, *Pennisetum purpureum* (Schumach), decreases damage by maize stem borers. *Int. J. Pest Manag.* 61, 73–79. <https://doi.org/10.1080/09670874.2014.999733>
- Verza, S.S., Forti, L.C., Matos, C.A.O., Garcia, M.G., Nagamoto, N.S., 2006. Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 47, 391–399.
- Verza, S.S. V, Agamoto, N.S.N., Orti, L.C.F., Newton, C.N.O.J., 2011. Preliminary studies on the effects of d -limonene to workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* and its implications for control. *Bull. Insectology* 64, 27–32.
- Visser, J.H., 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 121–144.
- Walters, D.R., 2011. What defenses Do Plant Use?, en: *Plant Defense*. Blackwell Publishing Ltd., West Sussex, United Kingdom, pp. 15–67.
- Zanetti, R., Ferreira Vilela, O., Zanuncio, J.C., Garcia Leite, H., Dias Freitas, G., 2000. Influence of the cultivated species and of the native vegetation on leaf-cutting ant nest density in eucalyptus plantations. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 35, 1–8.
- Zanetti, R., Zanuncio, J.C., Vilela, E.F., Leite, H.G., Jaffé, K., Oliveira, A.C., 2003. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Eucalyptus plantations in Brazil. *Sociobiology* 42, 433–442.

Zanuncio, J.C., Lemes, P.G., Antunes, L.R., Maia, J.L.S., Mendes, J.E.P., Tanganelli, K.M., Salvador, J.F., Serrão, J.E., 2016. The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. *Ann. For. Sci.* 73, 205–214. <https://doi.org/10.1007/s13595-016-0548-3>