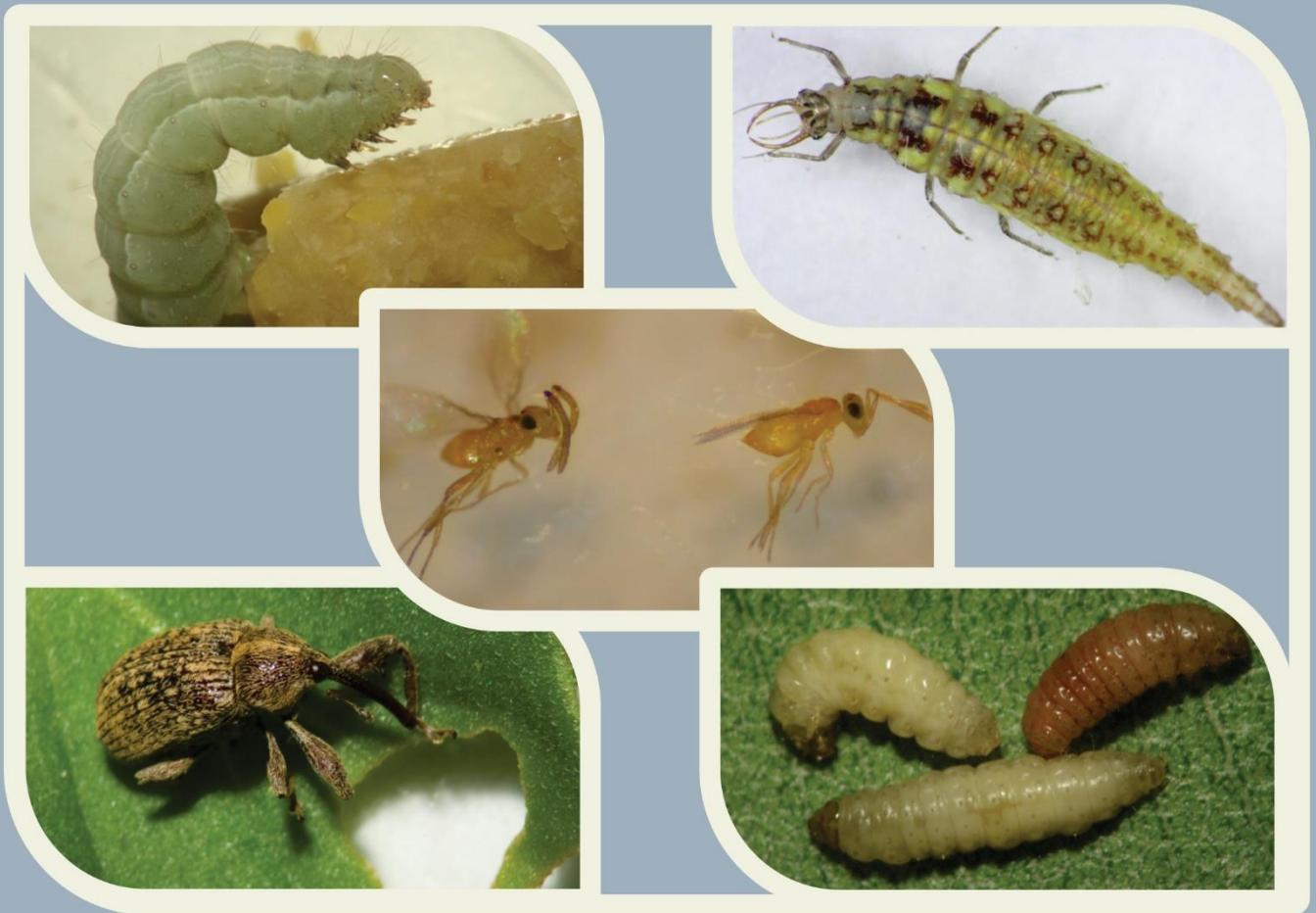


Desarrollo de herramientas para el manejo integrado de artrópodos perjudiciales

Resúmenes de actividades

Silvia N. López, Diego Sauka,
Diego Segura y Mariana Viscarret





Desarrollo de Herramientas para el Manejo Integrado de Artrópodos Perjudiciales

Resúmenes de actividades

Silvia N. López, Diego Sauka, Diego Segura y Mariana Viscarret



Secretaría
de Agroindustria



Ministerio de Producción y Trabajo
Presidencia de la Nación

Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola – IMYZA – CICVyA

2019

632.93 Desarrollo de herramientas para el manejo integrado de artrópodos perjudiciales :
D45 resúmenes de actividades / editores literarios: Silvia N. López... [et al.] –
Buenos Aires : Ediciones INTA, 2019.
88 p.

Recopilación de resúmenes técnicos del Proyecto Específico del Programa Nacional de Protección Vegetal PNPV 1135033 “Desarrollo de herramientas para el manejo integrado de artrópodos perjudiciales”.

ISBN 978-987-521-989-2 (digital)

i. López, Silvia N.

PLAGAS DE PLANTAS – ARTHROPODA –INSECTOS DAÑINOS – CONTROL DE PLAGAS – GESTIÓN DE LUCHA INTEGRADA – ARTRÓPODOS

INTA - DD

Editores Literarios: Silvia N. López, Diego Sauka, Diego Segura y Mariana Viscarret.

Diseño y Edición: Lorena La Fuente

Este libro

cuenta con licencia:



Índice

MÓDULO: CONTROL BIOLÓGICO POR ENTOMÓFAGOS E IMPACTO DE PLAGUICIDAS SOBRE ENEMIGOS NATURALES Y ARTRÓPODOS PERJUDICIALES..... 7

Estudios de almacenaje en frío sobre dos especies de <i>Trichogramma</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae)	8
Estudios biológicos sobre <i>Tupiocoris cucurbitaceus</i> (Hemiptera: Miridae)	11
Desarrollo de un protocolo de identificación molecular especie específico para el estudio de relaciones tróficas en un sistema hortícola.....	14
Estudios de control biológico con entomófagos en cultivos ornamentales	17
Evaluación de mejoras en la cría artificial del parasitoide de moscas de la fruta, <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> , que minimicen el efecto del superparasitismo	20
Bases químicas de la atracción del parasitoide <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> hacia frutos infestados por larvas hospedadoras de <i>Ceratitis capitata</i>	22
Integración del control biológico mediante el uso de entomófagos con la Técnica del Insecto Estéril para el control de la polilla del tomate <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae).....	25
Evaluación del efecto de plaguicidas sobre insectos benéficos en laboratorio.....	28

MÓDULO: CONTROL MICROBIANO MEDIANTE EL USO DE VIRUS, BACTERIAS Y HONGOS ENTOMOPATÓGENOS..... 31

Caracterización de patógenos asociados a lepidópteros plaga	32
Validación de estrategias de Manejo Integrado de carpocapsa en nogal: aplicaciones complementarias de granulovirus de <i>Cydia pomonella</i> (CpGV) con insecticidas ovicidas y larvicidas.....	36
Estrategias MIP para el control de Carpocapsa en montes de nogal de pequeños productores de la provincia de Mendoza	41
Desarrollo de una nueva formulación del granulovirus de <i>Cydia pomonella</i> : hacia la producción nacional.....	45
Clones recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> que expresan proteínas Cry individuales	48
Selección de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> con alta actividad insecticida para larvas de <i>Cydia pomonella</i> L. (Lepidoptera: Tortricidae).....	51
Aislamiento y caracterización de nuevos aislados de <i>Bacillus thuringiensis</i> a partir de larvas vivas y sanas de carpocapsa	53
Cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> con actividad nematocida.....	56
Aislamiento, selección y estudio de hongos con capacidad nematocida para ser empleados como agentes de control biológico de nematodos plaga.....	59
Aislamiento y selección de cepas de <i>Escovopsis</i> sp. virulentas contra <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> para el control de hormigas cortadoras	62
Control de hormigas cortadoras con hongos entomopatógenos y aceites esenciales de plantas aromáticas.....	64

MÓDULO: CONTROL GENÉTICO Y COMPORTAMENTAL..... 66

Mejoramiento del éxito de apareamiento luego del tratamiento con metopreno en machos de <i>Anastrepha fraterculus</i> (Diptera: Tephritidae): valor adaptativo y mecanismos de acción.....	67
--	----

Mejoramiento del éxito de apareamiento luego de la exposición a volátiles de guayaba en <i>Anastrepha fraterculus</i> (Diptera: Tephritidae): valor adaptativo y mecanismos de acción	70
Estudio del efecto de bacterias del tracto digestivo sobre el éxito copulatorio del macho de <i>Anastrepha fraterculus</i>	73
Estudio genético y funcional de las bacterias intestinales de larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i>	76
Estudios de las señales químicas en el sitio de oviposición en el picudo del algodón: su efecto disuasorio de nuevas infestaciones	78
Bases genéticas y moleculares de la determinación del sexo en <i>Anastrepha fraterculus</i> en apoyo al desarrollo e implementación de la Técnica del Insecto Estéril	80
Efecto de rayos X sobre el cariotipo y el esperma de <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae)	84
Efecto de la radiación gamma sobre parámetros biológicos de la polilla del tomate <i>Tuta absoluta</i>	86

Prólogo

Uno de los problemas más importantes de la agricultura moderna es la pérdida de rendimiento derivada del ataque de invertebrados perjudiciales. El uso de plaguicidas químicos para enfrentarlos se contrapone a la demanda mundial de alimentos sanos, con menores niveles de residuos químicos y obtenidos bajo sistemas productivos respetuosos del ambiente.

El Programa Nacional de Protección Vegetal del INTA esta fuertemente comprometido con la búsqueda de soluciones a esta problemática promoviendo el Manejo Integrado de Plagas (MIP) y sus distintas tácticas de control. En este marco, el Proyecto Específico del INTA PNPV1135033 “Desarrollo de herramientas para el manejo integrado de artrópodos perjudiciales” se propuso generar conocimientos útiles para el desarrollo de métodos de control biológico, microbiano, genético y comportamental de invertebrados plaga.

En lo que a organismos entomófagos se refiere, uno de los aspectos abordados fue el de la calidad de la cría y uso eficiente de organismos biocontroladores. Tomando como modelos biológicos tres especies (dos tricogramáticos parasitoides de huevos de lepidóptero y un mírido predador de aleiródidos) pudieron establecerse protocolos de cría y almacenaje en frío de estos entomófagos. Asimismo, se generaron conocimientos útiles para el manejo de parasitoides y predadores como agentes de control biológico estudiando aspectos tales como la depredación intragremial, identificación molecular de relaciones tróficas, integración con la Técnica del Insecto Estéril (TIE), evitación del supeparasitismo y control biológico en sistemas ornamentales. Paralelamente, se estableció el efecto de diversos fitosanitarios de uso frecuente en frutihorticultura sobre la fauna benéfica (entomófagos y polinizadores) estableciéndose una clasificación útil para la integración de ambos tipos de control en un programa de MIP.

Los estudios sobre control biológico microbiano generaron gran cantidad de conocimientos de utilidad para el control de distintas plagas y el desarrollo de futuros bioinsumos. Así, se caracterizaron varios aislamientos de baculovirus de diversos lepidópteros, entre ellos uno para el control de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* del que, a la fecha, se están evaluando formulados experimentales. Se logró establecer una estrategia para el clonado y expresión de genes *cry* en *Bacillus thuringiensis*, lo que permitió evaluar la toxicidad individual y de mezclas de protoxinas Cry sobre *C. pomonella*. Asimismo, se trabajó en la selección de las cepas de *B. thuringiensis* más tóxicas que contenían las proteínas insecticidas

más activas para esta plaga. Además, se demostró que el aislamiento de *B. thuringiensis* es factible a partir de un nuevo nicho ecológico como lo representan larvas vivas y sanas de *C. pomonella* y se realizó el primer reporte de cepas argentinas de *B. thuringiensis* con actividad nematocida. Finalmente, se seleccionaron cepas de hongos candidatas para el control biológico de hormigas cortadoras y una cepa de hongo nematófago nativo con gran potencial como controlador de nematodos fitoparásitos.

Respecto de la generación de conocimientos para ajustar la TIE para el control de la polilla del tomate, se continuaron los estudios sobre la esterilidad heredada comenzados en la cartera anterior pudiendo llegar a un protocolo de irradiación de pupas de *Tuta absoluta* con rayos X y gamma a partir de su efecto sobre la biología, espermatogénesis y citología del insecto. Respecto del desarrollo de la TIE para la mosca sudamericana de la fruta *Anastrepha fraterculus*, se generó información básica relacionada con el sexado genético de esta especie y sobre el aumento de la competitividad sexual de los machos a liberar a través de su exposición a diversas sustancias. Asimismo, se estudió el efecto disuasorio de compuestos químicos liberados por el picudo del algodón, que afectan su comportamiento de oviposición y que pueden ser utilizados en el manejo de esta plaga.

En este libro se presentan resumidos los principales resultados obtenidos a lo largo de los 4 años y 9 meses de desarrollo de este proyecto.

Silvia N. López
Coordinadora PNPV1135033

Módulo: Control biológico por entomófagos e impacto de plaguicidas sobre enemigos naturales y artrópodos perjudiciales

Estudios de almacenaje en frío sobre dos especies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)

Study of cold storage on two species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)

Cynthia Lorena Cagnotti, Silvia Noemí López y Mariana Mabel Viscarret*

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). *viscarret.mariana@inta.gob.ar

Los enemigos naturales han sido sometidos a diferentes estudios de almacenaje. Este almacenaje tiene como propósitos: ajustar el nivel de producción, sincronizar la presencia del enemigo natural con el huésped para controlar, simplificar su envío y liberación, y mantener un reservorio genético del enemigo natural que esta siendo criado. El objetivo del presente estudio fue evaluar el almacenaje en frío en dos especies de parasitoides, *Trichogramma nerudai* y *Trichogramma pretiosum*. Con este objetivo se realizaron dos tipos de estudio. En el primer tipo de ensayo se evaluó la combinación de tres tiempos de aclimatación (previo a la entrada en frío) de 0, 10 y 20 días a 11 °C (± 1) y cinco períodos de almacenaje en frío: 0, 25, 50, 75 y 100 días a 5 °C (± 1). Luego de la aclimatación y el almacenaje en frío, el material fue mantenido bajo condiciones de cría. Se evaluaron: supervivencia preimaginal, porcentaje de parasitismo, tiempo de emergencia medio de adultos y proporción sexual (en el caso de *T. nerudai*, ya que *T. pretiosum* es una especie telitóquica). El segundo tipo de ensayo, efecto materno, solo se realizó con el parasitoide *T. nerudai*. Huevos de *Sitotroga cerealella*, previamente tratados con luz ultravioleta, fueron expuestos a hembras recién emergidas durante 24 horas. Estos huevos fueron mantenidos a diferentes regímenes de luz/oscuridad (L:O): 12:12, 9:15; 6: 18 y 3: 21 (generación maternal). A partir de esta generación se obtuvieron las F1, una por cada período de L:O exponiendo huevos de *S. cerealella* a la generación materna. Luego los huevos parasitados fueron colocados a 11 ± 2 °C y oscuridad completa. Se registraron las siguientes variables: tiempo de emergencia del adulto, porcentaje de emergencia, proporción de hembras y estado preimaginal de individuos no emergidos luego del almacenaje.

Para el primer ensayo (aclimatación más almacenaje en frío), para *T. nerudai* se evaluaron la F0 y la F1. La emergencia de los adultos almacenados (F0) disminuyó significativamente con el incremento del tiempo de frío. Sin embargo, para el período más largo de aclimatación (20 días), los valores de emergencia fueron mayores que los obtenidos

para el período más corto (10 días) ($P < 0.0001$). La exposición de *T. nerudai* al frío ($5.4\text{ }^{\circ}\text{C}$) fue detrimental para su supervivencia. Los parasitoides tratados con un período de aclimatación de 20 días y posteriormente a tiempos de almacenaje en frío de 50, 75 y 100 días mostraron un tiempo de emergencia similar al del control. Independientemente del tiempo de almacenaje la proporción de hembras fue mayor cuando el período de aclimatación fue de 20 días en lugar de 10 ($P < 0.0001$). En general se observó que, para ambos períodos de aclimatación, a mayor tiempo de almacenaje en frío menor porcentaje de parasitismo. Para la F1, la proporción de adultos emergidos en la progenie (F1) fue afectada por la aclimatación y el tiempo de almacenaje en frío ($P < 0.0001$). Esta proporción fue mayor al 90% para todos los tratamientos excepto los de 100 días de almacenaje (15%-18%). En general para ambos períodos de aclimatación, se observó que a mayor tiempo de almacenaje en frío menor es la proporción de hembras. De acuerdo a los resultados obtenidos, solo el tratamiento de 20 días de aclimatación y 50 de almacenaje en frío sería de utilidad para establecer un protocolo de almacenaje en *T. nerudai*. En estas condiciones se observan una alta emergencia (aprox. 90%) y parasitismo (aprox. 75%), siendo el tiempo de emergencia del adulto y la proporción sexual similares a las de los controles. Para el ensayo de almacenaje de *T. pretiosum* se evaluó solo la generación parental F0. *T. pretiosum* resultó afectado fuertemente por el frío, con un efecto detrimental en la emergencia al aumentar el período de almacenaje ($P < 0.01$). Con 50 días de almacenaje, la emergencia cae por debajo del 60%. Sin embargo, para un mismo período de almacenaje, una mayor aclimatación produjo una mayor emergencia ($P < 0.01$). En el caso del efecto materno evaluado para *T. nerudai*, la mayoría de los autores consideran a la prepupa de *Trichogramma* spp. como el estado diapausante. En el presente estudio la mayor proporción de prepupas se registró para el tratamiento 12L:12O ($P < 0.01$). La máxima proporción de individuos diapausantes es inducida por luz de día-corto y este efecto se registra cuando el desarrollo de la descendencia (F1) ocurre a temperaturas cerca del umbral de desarrollo ($\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Por medio de disecciones se registraron pupas y adultos vivos. Un porcentaje significativo de pupas fue registrado, incluso más que prepupas para todos los períodos de L:O. Asimismo, hubo diferencias significativas, aunque el tratamiento de 12L:12O fue el que presentó menor proporción de pupas vivas ($P < 0.05$). El porcentaje de adultos emergidos fue significativamente menor para el tratamiento 9L:15O ($P < 0.01$), pudiendo indicar algún estado de quiescencia de estos individuos para el fotoperíodo estudiado. El tiempo de emergencia fue similar para todos los tratamientos. Considerando la posibilidad de almacenar *T. nerudai* los mejores tratamientos resultaron 3L:21O y 12L:12 $^{\circ}$ permitiendo mantener el material bajo almacenaje durante 3 meses con un porcentaje de emergencia de 80% y 70%, respectivamente. Cabe destacar que la mayor

proporción de hembras fue obtenida para el tratamiento 3L:21O, aumentando la factibilidad de utilizar este tratamiento para el almacenaje.

Publicaciones

- Méndez, L.M.; Botto, E.N.; Flores, D.; Cagnotti, C.L.; López, S.N.; Viscarret, M.M. 2016. Evaluación de tres clases de trigo para la cría de *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) como hospedante utilizado en la cría de enemigos naturales. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 75 (3-4): 105-116.
- Cagnotti, C.L.; Lois, M.; López, S.N.; Botto, E.N.; Viscarret, M.M. 2018. Cold storage of *Trichogramma nerudai* using an acclimation period. BioControl <https://doi.org/10.1007/s10526-018-9885>
- Cagnotti, C.L.; Lois, M.; López, S.N.; Viscarret, M.M. 2017. Protocolo de almacenaje en frío, con período de aclimatación, en *Trichogramma nerudai*. VI Reunión Argentina de Parasitoidólogos. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Viscarret, M.M. 2014. Study of factors inducing dormancy on *Trichogramma nerudai* Pintureau and Gerding and *T. pretiosum* Riley under rearing conditions. First Research Coordination Meeting of an FAO/IAEA Coordinated Research Project, 21-25/07/2014. Viena, Austria.
- Viscarret, M.M.; Cagnotti, C.L.; López, S.N. 2017. Storage and maternal effect on *Trichogramma nerudai*. 3rd RCM on Dormancy Management to Enable Mass-rearing and Increase Efficacy of Sterile Insects and Natural Enemies. 29 de mayo al 02 de junio de 2017. Viena, Austria.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA-IAEA N°18289. Study of factors inducing dormancy on *Trichogramma nerudai* Pintureau and Gerding and *T. pretiosum* Riley under rearing conditions. 2014-2019.

Estudios biológicos sobre *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae)

Biological studies on *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae)

Silvia Noemí López^{1*}, Virginia Fuentes Balluzzi¹, Paola Irene Carrizo², Marcelo Lois² y Mariana Mabel Viscarret¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (UBA). *lopez.silvia@inta.gob.ar

Las moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) son plagas del cultivo de tomate cuyo control se realiza normalmente con agroquímicos. Una alternativa es el control biológico mediante el uso de parasitoides y depredadores. Entre los entomófagos asociados a las moscas blancas en cultivos de tomate se destaca la chinche *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae). Este predador requiere, para su cría en laboratorio, un sustrato para oviposición y una presa para completar su desarrollo. Huevos de *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) son habitualmente utilizados como insumo para la cría de diversos entomófagos entre los cuales se encuentra esta chinche. Otro factor que afecta su desempeño es la presencia de otros enemigos naturales parasitoides o depredadores en el cultivo. *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) es un microhimenóptero que al parasitar ninfas de moscas blancas podría eventualmente ser presa de la chinche dando lugar a un proceso de depredación intragremial. Se desconoce la posible existencia de esta interacción entre estos dos enemigos naturales y el efecto sobre el control de la plaga. El objetivo de este trabajo fue evaluar dos aspectos vinculados al desempeño de *T. cucurbitaceus*: 1-la evaluación de diversos sustratos para su cría y 2-la evaluación de la depredación intragremial.

Para el primer objetivo se probaron tres dietas (tratamientos): dieta S: huevos esterilizados de *S. cerealella* (cría rutinaria), dieta A: cistos de *Artemia* spp., dieta M: huevos de *S. cerealella* y cistos de *Artemia* spp. en proporciones similares. La unidad experimental (u.e.) consistió en una caja de Petri con una base de agar sobre la que se colocó una hoja de tabaco (*Nicotiana tabacum* L). En cada u.e. se confinaron 3 hembras y 1 macho permitiendo la oviposición. Previa a la fecha estimada para la emergencia de las ninfas se le asignó a cada caja una de las tres dietas. Se registraron el número de ninfas que alcanzaron el estado adulto en cada u.e., el tiempo de desarrollo de ninfa a adulto y el n.º de adultos obtenidos/u.e./dieta. Los adultos emergidos de este ensayo fueron mantenidos en plantas, cada uno con su dieta de origen y la supervivencia, proporción sexual y fertilidad fueron evaluados en la F2. El tiempo de desarrollo de las ninfas de la F0 no presentó diferencias significativas entre las dietas (entre

10 y 13 días, $p=0,20$). La mortalidad de las ninfas bajo condiciones confinadas, en cajas de Petri, no fue significativamente diferente entre las dietas probadas (aproximadamente 60%, $p=0,88$). Los resultados obtenidos para la fecundidad de las hembras de la F2 no mostraron diferencias significativas entre las tres dietas probadas (entre 75 y 102 ninfas1/tipo de dieta, $p=0,65$). No se encontraron diferencias significativas para el número de adultos obtenidos/nº ninfas por planta y por pareja (entre 55 a 57, $p=0,99$). Los valores obtenidos para la proporción sexual en la F3 fueron elevados para las tres dietas probadas, encontrándose un mayor número de hembras en la dieta M (valores entre 66 y 98 % de hembras/n.º total de individuos, $p=0,04$). De acuerdo a los resultados encontrados es posible criar *T. cucurbitaceus*, al menos 3 generaciones, sin afectar sus parámetros biológicos.

Para el ensayo de depredación intragremial, se expusieron adultos hembras y machos de la chinche a ninfas de *T. vaporariorum* sin parasitar y a ninfas parasitadas por *E. formosa* durante 24 h, en pruebas con y sin opción. Los resultados obtenidos para los ensayos sin opción mostraron que tanto la hembra como el macho de *T. cucurbitaceus* consumieron significativamente más ninfas de mosca blanca no parasitadas que parasitadas por *E. formosa* (hembras: $p=0,0044$; machos: $p=0,046$). En las pruebas con opción los adultos de ambos sexos de *T. cucurbitaceus* consumieron un número similar de ninfas parasitadas y no parasitadas (hembras: $p=0,27$; machos: $p=0,37$). Los resultados de las pruebas sin opción demuestran que en condiciones de laboratorio *T. cucurbitaceus* es capaz de utilizar como presa tanto a la mosca blanca como a su parasitoide, aunque se observó un nivel de consumo menor sobre este último. En los ensayos con opción, *T. cucurbitaceus* no mostró preferencia por ningún tipo de presa, sino que se alimentó de ambas en igual cantidad. Los resultados obtenidos para los ensayos sin opción mostraron que el depredador consume menos presas cuando estas están parasitadas, esto podría deberse a un mayor valor nutricional del parasitoide en comparación con la mosca blanca, de modo que con menos ninfas parasitadas la chinche cubre sus requerimientos nutricionales. O bien, podrían existir diferencias en el tegumento entre las ninfas normales y parasitadas que hacen más dificultosa la depredación en estas últimas. No obstante, este resultado, ante la posibilidad de elegir entre ambos tipos de presas, *T. cucurbitaceus* no muestra preferencia por ninguna, sino que se alimenta de ambas en igual cantidad, existiendo una relación intragremial entre ambas especies, chinche y parasitoide.

Publicaciones

Fuentes Baluzzi, V. 2016. Interacción entre el predador *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae) y el parasitoide *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae), enemigos

- naturales de la mosca blanca de los invernáculos *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). Tesis de grado Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional de Luján.
- Lois, M. 2017. Utilización de *Artemia* spp. (Anostraca: Artemiidae) como presa alternativa para la cría de *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae), predador de plagas hortícolas. Tesis Tecnicatura en Producción Orgánica, FAUBA.
- Lois, M.; López, S.N.; Viscarret, M.M.; Carrizo, P.I. 2015. Evaluación de *Artemia* spp. (Anostraca: Artemiidae) como presa alternativa para la cría de *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae), predador de plagas hortícolas. IX Congreso Argentino de Entomología, 19-22 de mayo de 2015, Posadas, Misiones.
- Fuentes Baluzzi, V.; Lois, M.; Riquelme, M.B.; Viscarret, M.M.; Andorno, A.; López, S.N. 2015. Interacción entre el depredador *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae) y el parasitoide *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae), enemigos naturales de la mosca blanca de los invernáculos *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). IX Congreso Argentino de Entomología, 19-22 de mayo de 2015. Posadas, Misiones.

Desarrollo de un protocolo de identificación molecular especie específico para el estudio de relaciones tróficas en un sistema hortícola

Development of a molecular identification protocol specific to species for the study of trophic relationships in a horticultural system

Cynthia Lorena Cagnotti^{1*}, Silvia Noemí López¹ y Daniela Sandra Tosto²⁻³⁻⁴

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Biotecnología. ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ⁴Universidad de Buenos Aires (UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. *cagnotti.cynthia@inta.gob.ar

El conocimiento de las interacciones tróficas en agroecosistemas es fundamental para el establecimiento y la implementación de estrategias sustentables de manejo de plagas. La investigación realizada en agroecosistemas se ha focalizado especialmente en las relaciones entre predadores o parasitoides especialistas y sus presas o huéspedes, donde usualmente hay poca duda acerca de la identidad de estas últimas. Cuando los predadores o parasitoides son generalistas, la identificación y cuantificación de las presas y huéspedes es más problemática, ya que se alimentan o parasitan un rango de diferentes especies. Hasta el momento, el estudio de las relaciones predador-presa se basó en datos de observación de campo, pero la determinación exacta del rango de presas consumido por predadores generalistas es difícil de realizar bajo condiciones de campo. Por una parte, un método alternativo es la identificación de los restos de la presa dentro del contenido estomacal del predador mediante observación microscópica. Sin embargo, algunos predadores, como los míridos, poseen un aparato bucal chupador lo cual imposibilita el reconocimiento de las presas. Por otra parte, el método clásico para cuantificación de las tasas de parasitismo consiste en la identificación y cuantificación de los parasitoides adultos que emergen de los huéspedes colectados en el campo. En este caso, la primera limitante es la identificación del parasitoide que requiere de un especialista en sistemática. Además, alta mortalidad durante el transporte al laboratorio y el período de cría podría inducir subestimaciones del parasitismo real.

En los últimos años se han desarrollado diversas técnicas moleculares para estudiar los restos de presas dentro del aparato digestivo de predadores, las cuales se han basado en la identificación de proteínas específicas o de secuencias de ADN de la presa. Actualmente, las técnicas más utilizadas para analizar restos de presas en predadores son: el uso de anticuerpos monoclonales y la utilización de marcadores moleculares específicos, como los genes mitocondriales altamente conservados citocromo oxidasa I y II. Esta técnica también

se ha utilizado exitosamente para detectar ADN de los parasitoides dentro de los huéspedes. La detección de ADN mediante métodos de amplificación basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) muestra ciertas ventajas para la detección del ADN de la presa dentro del aparato digestivo del predador y del parasitoide dentro del huésped como ser rapidez, sensibilidad, disponibilidad de bases de datos de secuencias y detección del ADN de la presa dentro del aparato digestivo del predador varias horas después del evento de predación.

El objetivo del trabajo fue desarrollar un protocolo mediante el uso de técnicas moleculares para estudiar las interacciones tróficas predador-presa y parasitoide-huésped presentes en dos sistemas hortícolas. El primer sistema está integrado por la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (plaga), el predador *Tupiocoris cucurbitaceus* y el parasitoide *Encarsia formosa* que se encuentran asociados a esta plaga. Mientras que el segundo sistema está conformado por el pulgón *Myzus persicae* (plaga), el predador *Chrysoperla externa* y el parasitoide *Aphidius colemani* que son enemigos naturales de pulgones. Se realizó un ensayo de predación y otro de parasitismo con las especies del sistema 1 (*T. cucurbitaceus*-*T. vaporariorum*-*E. formosa*) para evaluar cuánto tiempo después de la predación o parasitismo es posible detectar indicios de las interacciones. Estos se realizaron en el Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica (IILB), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), CICVyA, INTA Castelar. En el ensayo de predación 20 ninfas IV de mosca blanca sobre un folíolo de tomate fueron ofrecidas a una hembra de *T. cucurbitaceus* (en inanición por 24 h). Se dejó alimentar a la chinche por 3 h y luego se contó el número de ninfas consumidas por cada predador. Únicamente se tomaron las hembras que consumieron al menos 4 ninfas y se guardaron en alcohol a 96° a distintos tiempos desde la finalización de la alimentación (inmediatamente finalizada la alimentación, 1 h después de finalizada la alimentación, pasadas 3 h, pasadas 5 h y pasadas 7 h). Además, se conservaron en alcohol muestras de hembras de *T. cucurbitaceus* con 24 h de inanición. Por una parte, en el ensayo de parasitismo hembras de *E. formosa* fueron aisladas y expuestas a folíolos de tomate con ninfas III-IV de mosca blanca durante 24 h para permitir el parasitismo. Durante los próximos 12 días, aproximadamente 300 ninfas de mosca blanca se guardaron diariamente en alcohol 96°. Por otra parte, para estudiar las interacciones entre las especies del sistema 2 (*C. externa*-*M. persicae* – *A. colemani*) se fijaron en alcohol larvas de crisopas alimentadas con pulgones y muestras de estos parasitados por *A. colemani*. En el Instituto de Biotecnología, CICVyA se realizaron extracciones de ADN de las muestras de *T. cucurbitaceus*/*C. externa* en inanición por 24 h, de *T. vaporariorum*/*M. persicae* no parasitadas y de muestras de *E. formosa* y *A. colemani* (kit de extracción para tejidos Quiagen). Se diseñaron *primers* específicos y se amplificaron regiones de la COI de las

especies estudiadas mediante una PCR convencional a partir de las extracciones de ADN mencionadas. Los productos de las PCR se purificaron y se enviaron al servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología. Una vez obtenidas las secuencias, se compararon y se identificaron variantes distintivas de cada especie. Sobre estas diferencias se diseñaron sets de *primers* especie-específicos (para PCR en tiempo real como en multiplex) y adecuados para realizar la detección simultánea de la COI de la presa, el predador y el parasitoide en las muestras de los ensayos que fueron conservadas en alcohol. Los *primers* fueron diseñados contemplando diferencias entre especies en el extremo 3', utilizando los programas CLUSTAL W y primer3 (v. 0.4.0).

Publicaciones

Cagnotti, C.; López, S.N.; Peluffo, L.; Viscarret, M.; Tosto, D. 2017. Desarrollo de un protocolo para la detección molecular de relaciones tróficas en sistemas de producción hortícola. XLVI Congreso Argentino de Genética, 01-04 de octubre de 2017. San Fernando del Valle de Catamarca, Catamarca.

Cagnotti, C.; López, S.N.; Gutiérrez, A.; Tosto, D. 2018. Identificación de relaciones tróficas en sistemas de producción hortícola utilizando marcadores moleculares. X Congreso Argentino de Entomología, 21-24 de mayo de 2018. Mendoza.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA PNBIO 1131044. Genómica aplicada a estudios de ecología molecular y diversidad genética. 2013-2018.

Proyecto AMIGA. Assessing and Monitoring the Impacts of Genetically Modified Plants on Agro-ecosystems. 2014-2016.

Estudios de control biológico con entomófagos en cultivos ornamentales

Studies of biological control with entomophagous in ornamental crops

Silvia Noemí López^{1*}, Andrea Verónica Andorno¹, Paola Carrizo² y Martín Fernández³

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Universidad de Buenos Aires (UBA). Departamento de Producción Vegetal, Cátedra de Zoología Agrícola. ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Floricultura.
*lopez.silvia@inta.gob.ar

Las plagas pueden ser limitantes para la producción de cultivos ornamentales. Dada la escasa información para el empleo del control biológico como táctica de manejo sanitario en estos cultivos, se planteó la necesidad de generar información de base relacionada con el desempeño de enemigos naturales entomófagos en estos sistemas. En este contexto, se llevaron adelante dos estudios en cultivos de interés para el Instituto de Floricultura del INTA Castelar.

1) *Desarrollo de los predadores Orius insidiosus (Hemiptera: Anthocoridae) y Tupiocoris cucurbitaceus (Hemiptera: Miridae) en dos especies ornamentales nativas. Glandularia sp. (Verbenaceae) y Calibrachoa sp. (Solanaceae) son especies vegetales cultivadas para ornato, particularmente Calibrachoa sp. se comercializa en los mercados de Europa y EE. UU. El INTA esta impulsando su producción y comercialización en el mercado nacional de flores para lograr su adopción entre productores de pequeña o mediana escala. Entre los problemas sanitarios que presentan estas especies se destacan el ataque de trips y moscas blancas. Una alternativa al uso de insecticidas para combatir estas plagas podría ser el control biológico mediante el uso de los predadores Orius insidiosus y Tupiocoris cucurbitaceus cuya efectividad como controladores biológicos de trips y moscas blancas, respectivamente, ha sido probada en diversos cultivos hortícolas. El desarrollo exitoso de estos predadores depende de la calidad adecuada de los tejidos de la planta hospedante, debido a que insertan sus huevos en el interior del tejido vegetal y realizan fitofagia en estadios tempranos de su fase inmadura. Esto requiere de la evaluación de Glandularia sp. y Calibrachoa sp. como hospedantes adecuadas para estos enemigos naturales. Para ello, en condiciones de laboratorio se analizaron las variables que determinan el cumplimiento exitoso de su ciclo vital: la longevidad, la fecundidad y la proporción sexual de la progenie producida sobre estas plantas. Se realizaron ensayos por separado para cada predador. El pimiento y el tomate fueron considerados como tratamiento control para*

O. insidiosus y *T. cucurbitaceus* respectivamente, ya que se conoce su buena aptitud como hospedera para cada predador. Parejas de adultos de cada especie fueron expuestas a plantas de *Calibrachoa* sp., *Glandularia* sp. y control en condiciones controladas (T° : 25 ± 3 °C, HR: 55-20 %, fotoperíodo: 16:8 (L: O)) en un DCA (n=10). Se registraron día por medio: longevidad de la hembra y del macho de cada pareja y número de ninfas y adultos, mortalidad ninfal y proporción sexual de la F1. Los resultados fueron analizados mediante MLMG (distribución Poisson y Binomial, función de enlace: *log*) y DGC como prueba *a posteriori*.

Para *O. insidiosus* se observó que la longevidad de los adultos de la F0 y la proporción sexual de la F1 fueron semejantes entre las plantas hospederas. La cantidad de ninfas producidas en la F1 fue significativamente mayor en el pimiento respecto de las dos especies ornamentales. Hubo más adultos en la descendencia en pimiento respecto de *Glandularia* sp., y a su vez en esta respecto de *Calibrachoa* sp. Finalmente, la mortalidad ninfal fue significativamente mayor en *Calibrachoa* sp. comparada con *Glandularia* sp. y menor en el pimiento. Estos resultados indican que *Calibrachoa* sp. posee una calidad hospedera inferior que *Glandularia* sp. y esta una calidad inferior a *C. annuum*, aunque aceptable para el desarrollo de *O. insidiosus*. Respecto de *T. cucurbitaceus*, tanto *Glandularia* como *Calibrachoa* resultaron igualmente aceptables como hospedante de esta chinche ya que, excepto la longevidad de los machos, las pruebas no mostraron diferencias significativas entre hospederas.

2) *Evaluación de Encarsia formosa y Orius insidiosus para el control de Trialeurodes vaporariorum y Frankliniella occidentalis en Gerbera jamesonii bajo invernáculo.* Se evaluó al parasitoide *Encarsia formosa* (Ef) y al depredador *Orius insidiosus* (Oi) como controladores de *Trialeurodes vaporariorum* y *Frankliniella occidentalis*, respectivamente, en plantas de *Gerbera*. En un invernáculo se ubicaron 24 jaulas de exclusión (55x60x80 cm) con una planta de *Gerbera* infestada naturalmente con ambas plagas. Se asignaron al azar los tratamientos: T1=control, T2=introducción Oi (6 parejas/semana) durante 3 semanas, T3=introducción Ef (10 adultos/semana) durante 3 semanas, T4=introducción Oi y Ef a las dosis y frecuencias mencionadas en T2 y T3. Semanalmente se contabilizó el número de trips/flor, de ninfas y adultos de Oi/flor; número de adultos de *Trialeurodes vaporariorum* y de ninfas y adultos de Oi/3 hojas; número de ninfas de mosca blanca sanas, parasitadas y predadas/hoja. Los resultados muestran que la población de adultos de mosca blanca fue significativamente menor en los tratamientos de liberación de Ef (T3 y T4). En T4. Asimismo, la población de ninfas fue significativamente menor posiblemente debido a la acción conjunta de ambos entomófagos, con niveles máximos de 80 % de las ninfas parasitadas y 3,5 ninfas predadas/hoja. Las poblaciones de trips se mantuvieron en niveles bajos no observándose

diferencias entre los tratamientos. Los resultados obtenidos son promisorios para el control de mosca blanca mediante biocontroladores. Se requiere realizar ensayos para validar los resultados bajo condiciones de producción, así como profundizar los estudios sobre control de trips.

Publicaciones

Fernández, M.; Andorno, A.; Mata, D.; López, S.N. 2016. Evaluación de *Encarsia formosa* y *Orius insidiosus* para el control biológico de *Trialetrodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) y *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) en gerbera bajo invernáculo. XXIX Congreso Argentino de Horticultura, 26-29 de septiembre de 2016. Santa Fe, Argentina.

López, S.N.; Del Punta, L.; Fernández, M.; Carrizo, P. 2018. Desarrollo del predador *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) en las especies ornamentales *Calibrachoa* sp. (Solanaceae) y *Glandularia* sp. (Verbenaceae). X Congreso Argentino de Entomología, 21-24 de mayo de 2018. Mendoza, Argentina.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA PNHFA 1106093. Desarrollo y ajuste de tecnologías para una producción florícola sustentable y de calidad. 2013-2018.

Evaluación de mejoras en la cría artificial del parasitoide de moscas de la fruta, *Diachasmimorpha longicaudata*, que minimicen el efecto del superparasitismo

Superparasitism in the artificial rearing of *Diachasmimorpha longicaudata* using *Ceratitis capitata* larvae as host

Francisco Devescovi^{1,2*}, Mariana Mabel Viscarret³, Jorge Luis Cladera¹ y Diego Fernando Segura^{1,2}

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Genética "E.A. Favret". ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA).
*frandevescovi00@hotmail.com

El endoparasitoide solitario larval *Diachasmimorpha longicaudata* ha sido ampliamente utilizado como agente de control de moscas de la fruta, ya que estas generan grandes pérdidas económicas. El control biológico de moscas de la fruta de importancia económica esta siendo implementado en algunas zonas de la provincia de San Juan, Argentina y en otras partes del mundo mediante el endoparasitoide larvo-pupal *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae). Para su producción y liberación masiva se requieren protocolos que minimicen los costos y maximicen el control de la plaga. Con el objetivo general de conocer los procesos que influyen en su desarrollo y ciclo de vida utilizando *Ceratitis capitata* como especie hospedadora, en esta tesis se evaluaron los efectos del fenómeno conocido como superparasitismo (ej. oviposición en un hospedador previamente parasitado por la misma u otra hembra de la misma especie) sobre parámetros relacionados con el éxito reproductivo y con aspectos del comportamiento, genética y electrofisiología. El superparasitismo resultó ser un fenómeno común en la cría experimental del IGEAF (INTA, Castelar). En aquellos niveles de superparasitismo en los que fue posible un completo desarrollo del adulto no se registraron consecuencias asociadas al éxito reproductivo. La eliminación de las larvas competidoras durante el primer estadio larval permitiría que la mayor parte del desarrollo se produzca sin competencia, explicando la falta de efecto sobre el adulto. Estudios comportamentales mostraron que algunas hembras evitan superparasitar mientras que otras oviponen al azar, esto sugiere en estas últimas una incapacidad para discriminar larvas parasitadas y no parasitadas. Al evaluar un posible componente genético en hembras con y sin esa habilidad no se encontró una correlación con sus respectivas hijas (análisis de correlación e isoclinas). Estimulaciones en el extremo del ovipositor mediante técnicas de

electrofisiología no evidenciaron una habilidad de discriminación entre larvas parasitadas y no parasitadas por parte del adulto. En conjunto, los resultados de esta actividad aportan nueva información sobre la biología básica de *D. longicaudata*, y contribuyen a futuros estudios dirigidos a una mejora en el proceso de cría artificial de este agente de control biológico de moscas de los frutos.

Publicaciones

- Devescovi, F.; Bachmann, G.E.; Nussenbaum, A.L.; Viscarret, M.; Cladera, J.L.; Segura, D.F. 2017. Effects of superparasitism on immature and adult stages of *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) reared on *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae). Bulletin of Entomological Research, 107(6), 756-767.
- Devescovi, F.; Nussenbaum, A.L.; Bachmann, G.E.; Lanzavecchia, S.B.; Cladera, J.L.; Segura, D.F. 2018. Genetic variation in host discrimination ability in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) attacking *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). 10th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. México.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

- PICT 2015-0182. Estudio de semioquímicos utilizados por el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) durante la búsqueda del hospedador, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).

Bases químicas de la atracción del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* hacia frutos infestados por larvas hospedadoras de *Ceratitis capitata*

Chemical basis of the attraction of *Diachasmimorpha longicaudata* to fruits infested by *Ceratitis capitata*

Francisco Devescovi^{1,2}, Patricia Carina Fernández^{2,3}, Guillermo Enrique Bachmann^{1,2}, Ana Laura Nussenbaum^{1,2} y Diego Fernando Segura^{1,2*}

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Genética "E.A. Favret". ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Delta del Paraná.
*segura.diego@inta.gob.ar

El control biológico de moscas de la fruta de importancia económica se está implementando en la provincia de San Juan, Argentina y en otras partes del mundo mediante el endoparasitoide larvo-pupal *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae). Para su producción y liberación masiva se requieren protocolos que minimicen los costos y maximicen el control de la plaga. En este sentido, un cebo atrayente permitiría el monitoreo de la abundancia y distribución de este agente de control, brindando información para una mejor planificación. Como en muchos insectos, las hembras de esta especie son capaces de ubicar el hábitat y localizar a su hospedador mediante información química (semioquímicos). Dicho hospedador, al momento de ser atacado por el parasitoide se encuentra alimentándose y desarrollándose dentro de los frutos de numerosas especies frutales. En un estudio previo, y utilizando un olfatómetro de flujo estacionario, se determinó que naranjas infestadas con larvas de la mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae), o con distintos grados de maduración generan una atracción significativamente mayor de hembras de este parasitoide al ser ofrecidas frente a naranjas no tratadas. El objetivo del presente trabajo fue confirmar las bases químicas del comportamiento de orientación de *D. longicaudata* hacia su hospedador, *C. capitata*, utilizando un olfatómetro dinámico en Y (Experimento 1) e identificar compuestos químicos candidatos asociados a este comportamiento (Experimento 2). Se evaluaron naranjas infestadas con larvas de mosca (NI), naranjas infestadas, pero en las cuales las larvas ya habían abandonado el fruto (NA) y naranjas sin infestación, pero en avanzado grado de maduración (NM). Como control se utilizaron naranjas no infestadas y maduras (NC). Para el Experimento 1, un parasitoide hembra fecundado de entre 5-10 días de edad fue evaluado

frente a una naranja tratada (NI/NA/NM) y una naranja no tratada (NC), ofrecidas en un olfatómetro en Y, sin contacto visual. La hembra fue liberada en el brazo principal, registrándose la primera elección realizada al entrar en uno de los brazos secundarios por donde fluían los compuestos volátiles de cada tratamiento. Se evaluaron 40 hembras (réplicas) por tratamiento y se comparó la frecuencia de elección hacia cada tipo de fruta mediante una prueba de G. Para el Experimento 2 se utilizaron los mismos tipos de naranjas para coleccionar los respectivos compuestos volátiles. Cada naranja fue colocada en una bolsa para horno (B.p. Premium) y cerrada herméticamente. Durante 4 h se aplicó un flujo de aire limpio (filtrado con carbón activado) mediante una bomba y tubos de teflón, conectando una entrada y una salida a la bolsa con la naranja. A la salida se colocó un filtro adsorbente (HayeSep) para retener dichos volátiles, que luego fueron eluidos con 250 μ l de diclorometano y recogidos en un vial. Se obtuvieron al menos 5 réplicas de cada tratamiento. Estas muestras fueron analizadas mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Utilizando la base de datos NIST se identificó un gran número de compuestos. Se consideró que un compuesto determinado era propio del tratamiento si era detectado en al menos 3 muestras. Mediante comparaciones de los perfiles cromatográficos se determinaron los compuestos únicos o compartidos por dos o todos los tipos de frutas. En el Experimento 1 hubo una frecuencia significativamente mayor en la elección de cada tipo de naranja tratada (NI/NA/NM) frente a naranjas no tratadas (NC). Por un lado, los análisis químicos realizados en el Experimento 2 revelaron al menos tres compuestos compartidos por los tres tipos de naranjas tratadas, no presentes en el tratamiento control: γ -terpineno, terpinen-4-ol y α -terpineol. Por otro lado, también se encontraron compuestos exclusivos de cada tratamiento: NI: acetato de isopentilo, acetato de geranilo, E-dihidrocarvona, longifoleno, α -terpinoleno y acetato de bencilo, entre otros; NA: α -copano y Alloaromadendreno; NM: α -felandreno, lactona de lavanda, acetato de terpinilo y óxido de cis-lonalool. Los resultados comportamentales del Experimento 1 demostraron que la atracción de las hembras de *D. longicaudata* es provocada por estímulos volátiles, aunque no exclusivamente asociados a la infestación por su hospedador *C. capitata*, sino también al avance natural de maduración y putrefacción de la fruta. Los tres compuestos volátiles compartidos por las naranjas atractivas servirán como candidatos para ser evaluados en próximos bioensayos de atracción con compuestos sintéticos análogos, con la finalidad de obtener un cebo atrayente para su uso en el monitoreo de este parasitoide en el campo.

Publicaciones

- Segura, D.; Nussenbaum, A.; Viscarret, M.; Devescovi, F.; Bachmann, G.; Corley, J.; Ovruski S.; Cladera, J. 2016. Innate Host Habitat Preference in the Parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*: Functional Significance and Modifications through Learning. Plos ONE. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152222>
- Devescovi, F.; Fernandez, P.; Bachmann, G.; Nussenbaum, A.; Schiavo, P.; Segura, D. 2016. Identification of volatile compounds obtained from larvae-infested and rotten fruit attractive for the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae). 1st Joint Meeting ISCE/ALAEQ, Brasil.
- Devescovi, F.; Fernandez, P.; Bachmann, G.; Nussenbaum, A.; Schiavo, P.; Segura, D. 2016. Semioquímicos atrayentes del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para su uso en programas de control biológico. VI Reunión Argentina de Parasitoidólogos. Argentina.
- Devescovi, F.; Fernandez, P.; Bachmann, G.; Nussenbaum, A.; Schiavo, P. Segura, D. 2017. Identification of volatile compounds obtained from sources attractive to the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). The 5th International Entomophagous Insects Conference. Japón.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

- PICT 2015-0182. Estudio de semioquímicos utilizados por el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) durante la búsqueda del hospedador, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).

Integración del control biológico mediante el uso de entomófagos con la Técnica del Insecto Estéril para el control de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Development of the sterile Insect technique and its integration with biological control with entomophagous parasitoids for the control of the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)

Cynthia Lorena Cagnotti^{1*} y Silvia Noemí López¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). *cagnotti.cynthia@inta.gob.ar

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza más cultivada en invernadero en la Argentina, concentrándose esta actividad en las provincias de Corrientes y Buenos Aires mientras que Mendoza es la principal provincia productora de tomate a campo. Las plagas constituyen uno de los factores limitantes de la producción de tomate; *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) es la plaga clave de este cultivo en gran parte de la zona productiva de nuestro país. Este es un insecto de distribución Neotropical (Centro y Sudamérica), que ataca al cultivo desde la etapa de almácigo hasta la cosecha. La larva es la que produce el daño directo sobre las plantas, ya que se alimenta del mesófilo foliar, barrena brotes o perfora frutos generando enormes pérdidas económicas a los productores cuando no se aplican controles.

El principal método de control de la polilla del tomate consiste en el uso de plaguicidas. Ante la presencia de elevadas infestaciones, los productores han intensificado el uso de productos químicos aumentando las dosis y el número de aplicaciones recomendadas. Esto ha generado la aparición de poblaciones de *T. absoluta* resistentes a varios principios activos de productos recomendados. Además, el empleo de plaguicidas afecta negativamente a las poblaciones de insectos benéficos (parasitoides y predadores) a través de efectos letales y subletales. Dadas las actuales exigencias de los mercados locales y regionales de una producción con bajo nivel de contaminantes, se han propuesto otros métodos de control de bajo impacto ambiental contra *T. absoluta*, entre ellos, el empleo de la Esterilidad Heredada (EH) y el control biológico mediante el uso de parasitoides o predadores.

En cuanto a la EH, existe evidencia teórica y experimental que sugiere que el potencial total de la EH para suprimir poblaciones de lepidópteros plagas podría ser alcanzado cuando es combinada con otros métodos de control, logrando un efecto aditivo o sinérgico. Por lo

tanto, se espera que con el empleo combinado de un parasitoide/predador y la EH para el control de la polilla del tomate, se alcancen mejores niveles de supresión poblacional que con el uso de cualquiera de estos métodos por separado. La utilización de la EH para el control de lepidópteros plagas implica que se esterilizan y liberan machos y hembras, de esta forma todos los tipos de cópulas podrían ocurrir en el campo, incluyendo aquellos que involucran polillas irradiadas. Las hembras irradiadas depositan huevos no viables en el campo, los cuales podrían servir como huéspedes para parasitoides del género *Trichogramma* como *Trichogramma nerudai* y *Trichogramma pretiosum* o como alimento para chinches predadoras como el mívrido sudamericano *Tupiocoris cucurbitaceus*.

Los objetivos del trabajo fueron los siguientes: 1) evaluar la aceptación por parasitoides tricogramátidos de los huevos producidos por individuos irradiados de *T. absoluta* y la adecuación de estos huevos para el desarrollo de los parasitoides, y 2) evaluar si los huevos producidos por individuos irradiados de *T. absoluta* son adecuados como presas para la chinche *T. cucurbitaceus*.

Por una parte, se estudió la aceptabilidad y adecuación de huevos provenientes de parejas de *T. absoluta* irradiadas para el parasitismo de los parasitoides oófagos *T. nerudai* y *T. pretiosum*. Para ello se irradiaron pupas de *T. absoluta* con rayos X (20834 R) y los adultos emergidos fueron separados en parejas de acuerdo con los siguientes cruzamientos: ♂_N x ♀_N, ♂_I x ♀_N, ♂_N x ♀_I (N: no tratado, I: irradiado). En un experimento de no elección se expusieron 40 huevos de cada cruzamiento a una hembra de cada parasitoide durante 24 h. En el experimento de elección, cada hembra de cada parasitoide fue expuesta a 40 huevos de polilla no irradiada y 40 de polilla irradiada. Se registró el número de huevos parasitados y la emergencia de la generación filial.

Por otra parte, se estudió el consumo de huevos de *T. absoluta* (procedentes de los mismos cruzamientos que en los ensayos anteriores) por el predador sudamericano *T. cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae), en experimentos de elección y no elección. En el experimento de no elección se expusieron 200 huevos de cada cruzamiento a una hembra de *T. cucurbitaceus* y en el de elección la hembra fue expuesta a 200 huevos de polilla no irradiada y a 200 huevos de polilla irradiada. Se registró el número de huevos consumidos.

Se obtuvieron los siguientes resultados: 1) todos los huevos de *T. absoluta* fueron aceptados para la oviposición por *T. nerudai* y adecuados para su desarrollo. No obstante, los huevos de hembras irradiadas fueron significativamente menos parasitados que los procedentes de hembras no tratadas. *T. pretiosum* mostró un bajo parasitismo en todos los tipos de huevos. En el experimento de elección, tanto *T. nerudai* como *T. pretiosum* no mostraron diferencias en el parasitismo entre los huevos de polillas irradiadas y no irradiadas.

2) Respecto de *T. cucurbitaceus*, en el experimento de no elección, las hembras predadoras consumieron la misma cantidad de huevos independientemente de su origen. En el experimento de elección, *T. cucurbitaceus* consumió un número similar de huevos de padres no tratados que de aquellos en los que el macho había sido irradiado. Pero consumió más huevos ovipuestos por polillas irradiadas que por polillas no tratadas.

Estos resultados proveen evidencias de que los huevos dejados por padres irradiados son aceptados para la oviposición y adecuados para el desarrollo de los parasitoides estudiados, así como para el consumo del depredador evaluado y respaldan la idea de que la Esterilidad Heredada puede ser usada de manera integrada con estos enemigos naturales para el control de *T. absoluta*.

Publicaciones

Cagnotti, C. 2014. Desarrollo de la Técnica del Insecto Estéril y su integración con el control biológico mediante entomófagos parasitoides para el control de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Cagnotti, C.L.; Andorno, A.V.; Hernández, C.M.; Carabajal Paladino, L.; Botto, E.N.; López, S.N. 2016. Inherited sterility in *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): pest population suppression and potential for combined use with a generalist predator. Florida Entomologist. 99: 87-94.

Cagnotti, C.L.; Hernández, C.M.; Andorno, A.V.; Viscarret, M.M.; Riquelme, M.B.; Botto, E.N.; López, S.N. 2016. Acceptability and suitability of *Tuta absoluta* eggs from irradiated parents to parasitism by *Trichogramma nerudai* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Agricultural and Forest Entomology. 18:198-205.

Cagnotti, C.L.; Carabajal, L.Z.; López, S.N. 2014. Development of the sterile insect technique to control the tomato moth *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Final Research Coordination Meeting on Increasing the Efficiency of Lepidoptera SIT by Enhanced Quality Control. IAEA (International Atomic Energy Agency). 02-07/06/2014. Kelowna, Canadá.

Proyecto con el que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA-IAEA N° 16332. Development of the Sterile Insect Technique to control the tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) (financiado por la Agencia Internacional de Energía Atómica). 2010-2014.

Evaluación del efecto de plaguicidas sobre insectos benéficos en laboratorio

Laboratory test for evaluating effects of pesticides on the beneficial insects

Andrea Verónica Andorno^{1*}, Paola Irene Carrizo², Carmen Marcela Hernández¹, Agustín Pace³, Lucila Caruso³, Juan Ávila³, Mariana Mabel Viscarret¹ y Silvia Noemí López¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. (IMyZA). ²Universidad de Buenos Aires (UBA). Facultad de Agronomía. ³Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA). Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias. *andorno.andrea@inta.gob.ar

La Organización Internacional de Control Biológico (OICB) ha delineado pautas para evaluar el impacto de los fitosanitarios sobre los insectos benéficos, una condición necesaria para lograr la integración del control biológico y el químico. En el Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica del IMYZA, hemos evaluado el efecto de algunos plaguicidas habitualmente utilizados en producciones hortícolas y frutícolas sobre tres predadores: *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae); *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae); *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), y un polinizador: *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae). Se evaluó la toxicidad directa de cuatro insecticidas de síntesis: Cyazypyr (60cc/hl), Flubendiamida (25cc/hl), Indoxacarb (200g/hl) e Imidacloprid (55cc/hl); un insecticida botánico: Neemazal (400 cc/hl); un fungicida: Azoxistrobina+Difenoconazole (100cc/hl) y dos biopreparados: tinturas de ajo y ají picante (ambos dilución 1:10). En todos los casos se determinó la supervivencia luego de 24h de exposición a los residuos secos (control: agua), y bajo condiciones controladas de 24±1 °C, 70±10 % HR y fotoperíodo de 16:8 L:O. Para ello, se utilizó un dispositivo (unidad experimental) conformado por dos placas de vidrio de 13x13 cm separadas por un cilindro de PVC de 2 cm de alto con 4 orificios: 3 revestidos con tela de *voile* para ventilar y 1 con tapón de algodón, removible para la provisión de alimento. Para la toxicidad directa, en el Instituto de Ingeniería Rural se aplicaron los productos con un equipo con boquilla cono hueco 8001 Teejet® (presión: 2 bar, 0,40 m de altura, velocidad: 4,5 km/h). En tal caso, los individuos (predadores en estado adulto y ninfa; obreras del polinizador) fueron expuestos a las placas, luego de ser secadas al aire. Para la persistencia, fueron asperjadas manualmente hojas de pimiento hasta el goteo, exponiendo los individuos a los residuos secos luego de transcurridos 4, 14 y 29 días desde la aplicación. El efecto sobre la fecundidad, medida como el nro. de huevos o ninfas/♀/día fue estudiado en las hembras sobrevivientes de cada tratamiento, luego de introducir las en recipientes plásticos o cajas de Petri con el sustrato adecuado para la oviposición. Conforme a los resultados de

dichos estudios, los productos fueron clasificados siguiendo las categorías propuestas por la OICB.

O. insidiosus: Cyazypyr, Flubendiamida y Azoxistrobina+Difenoconazole no difirieron significativamente respecto del control y resultaron inofensivos para la variable supervivencia. La fecundidad fue significativamente menor en las hembras expuestas a Indoxacarb, lo que clasificó a este producto como moderadamente perjudicial. Respecto de su persistencia, redujo la supervivencia y fecundidad de los adultos expuestos, hasta los 29 días anteriores a la exposición, clasificando a este producto como persistente. La tintura de ají picante redujo la supervivencia en un 10 %, pero ningún biopreparado afectó significativamente la fecundidad. Según el criterio de clasificación de la OICB, la tintura de ajo resultó inofensiva y la tintura de ají picante, poco perjudicial.

T. cucurbitaceus: Cyazypyr, Flubendiamida y Azoxistrobina+Difenoconazole no difirieron significativamente respecto del control y resultaron inofensivos para la supervivencia. La fecundidad resultó significativamente reducida en un 80 % en las hembras expuestas a Indoxacarb, clasificando a este producto como moderadamente perjudicial. Al evaluar la toxicidad directa de los biopreparados estudiados se observó que la tintura de ají picante resultó moderadamente perjudicial, mientras que la tintura de ajo se clasificó como inofensiva.

C. externa: Tanto el Imidacloprid como el Neemazal no afectaron significativamente la fecundidad de los adultos expuestos respecto del control. Sin embargo, los adultos expuestos al Imidacloprid vieron reducida significativamente su supervivencia (50% respecto del control) y por lo tanto este producto resultó poco perjudicial. Los biopreparados resultaron inofensivos al contacto directo con los adultos de *C. externa*.

B. atratus: Luego de 72 h de exposición a residuos secos de Cyazypyr, las obreras de *B. atratus* no presentaron diferencias significativas en la supervivencia respecto del control, clasificando a este producto como inofensivo.

La información expuesta en esta presentación se considera relevante y puede ser introducida en una base de datos como un insumo de utilidad para la integración de tácticas en un programa de MIP, brindando la información para la selección de los pesticidas menos nocivos para la fauna auxiliar.

Publicaciones

Andorno, A.V.; López, S.N.; Riquelme, M.B. 2014. Compatibilidad de algunos insecticidas en cultivos hortícolas. Ediciones INTA.

- Andorno, A.V.; Canalda, A.E.; Carrizo, P.I.; López, S.N. 2015. Efecto de algunos plaguicidas sobre la supervivencia de ninfas de *Orius insidiosus* (Hemiptera: Antocoridae). XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 7-9 de octubre de 2015. Santa Fe. Argentina.
- Andorno, A.V.; Carrizo, P.I.; Riquelme, M.B.; López, S.N. 2017. Compatibilidad de insecticidas químicos e insectos benéficos en cultivos hortícolas. Jornadas de Actualización del efecto de plaguicidas sobre enemigos naturales en horticultura. La Plata, Buenos Aires.
- Ávila J., Pace A., Andorno A. V. y C.M. Hernández. 2018. Pruebas de toxicidad directa de biopreparados sobre el predador *Crysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopiade). Jornadas Fitosanitarias Argentinas, 10-12 de octubre de 2018. Tucumán, Argentina.
- Canalda, A.E.; Masiá, G.; Carrizo, P.; López, S.N.; Andorno, A.V. 2015. Compatibilidad de algunos insecticidas/fungicidas con *Orius insidiosus* (Hemiptera: Antocoridae), enemigo natural de plagas hortícolas. IX Congreso Argentino de Entomología. 19-22 de mayo de 2015. Argentina.
- Carrizo, P.I.; Sánchez, A.M.; Andorno, A.V.; López, S.N. 2016. Efecto de residualidad de indoxacarb sobre la supervivencia y fecundidad de adultos de *Orius insidiosus* (Hemiptera: Antocoridae). H-SV 003. 39.º Congreso Argentino de Horticultura. Santa Fe, Argentina.
- Pace, A.; Ávila, J.; Hernández, C.M.; Andorno, A.V. 2018. Efectos letales y subletales de biopreparados sobre ninfas de *Orius insidiosus* (Hemiptera: Antocoridae). Jornadas Fitosanitarias Argentinas, 10-12 de octubre de 2018. Tucumán, Argentina.
- Viscarret, M.M.; Caruso, L.; Pace, A.; Andorno, A. 2018. Efecto de biopreparados sobre la supervivencia y fecundidad de *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae). X Congreso Argentino de Entomología, 21-24 de mayo de 2018. Mendoza, Argentina.
- Viscarret, M.M.; Pace, A.; Caruso, L.; Andorno, A.V. 2018. Efecto de biopreparados sobre la supervivencia y fecundidad de adultos de *Orius insidiosus* (Hemiptera: Antocoridae). X Congreso Argentino de Entomología, 21-24 de mayo de 2018. Mendoza, Argentina.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Servicio Técnico INTA – Dupont Argentina (Nº 597) para la evaluación del efecto del principio activo Cyantraniliprole (producto comercial Benevia®) sobre el polinizador *Bombus atratus*. 2014-2015.

UBACYT 20020130200112BA. Impacto de productos fitosanitarios convencionales y bioinsumos sobre calidad del suelo, oligochetos, especies vegetales terrestres y entomófagos presentes en sistemas cultivados. 2013-2017.

Módulo: Control microbiano mediante el uso de virus, bacterias y hongos entomopatógenos

Caracterización de patógenos asociados a lepidópteros plaga

Characterization of pathogens associated with lepidopteran pests

Joel Demian Arneodo^{1,2*}, Catalina Taibo³, Emilia Inés Balbi⁴, Violeta Jakubowicz^{1,2}, Ricardo Salvador¹, Graciela Mabel Quintana¹, Marcelo Farinon¹, Leticia Ferrelli² y Alicia Sciocco-Cap¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA). Laboratorio de Microscopía. ⁴Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Marcos Juárez. *arneodo.joel@inta.gob.ar

Los lepidópteros son susceptibles a la infección por diversos agentes patógenos. Los baculovirus (virus de ADN doble cadena) y los microsporidios (grupo relacionado con los hongos) se destacan entre los más comunes. Los primeros, además, presentan un alto potencial para ser usados como controladores biológicos. A continuación, se refieren algunas de las principales investigaciones en la temática realizadas durante los últimos años el IMyZA.

Ocurrencia y variabilidad genética del granulovirus de la carpocapsa (CpGV) en Argentina. Se muestrearon larvas de *Cydia pomonella* en montes frutales de diversas zonas de Argentina con distinta historia de manejo, donde insecticidas virales a base de CpGV: a) fueron usados extensivamente (2000 - 2005) y luego discontinuados (Catamarca), b) fueron aplicados muy esporádicamente (Mendoza) y c) los tratamientos se realizan ininterrumpidamente desde 2001 hasta el presente (Río Negro, Alto Valle). En cada región se relevaron lotes con aplicación directa de virus (actual o pasada) y lotes no tratados, con distinto grado de cercanía de los primeros. Además, se colectaron insectos en regiones alejadas de los puntos de aplicación de virus (Córdoba, Buenos Aires, Neuquén y RN –zona andina y Valle Medio–), en busca de aislamientos autóctonos. Se analizaron por PCR 825 larvas, y se secuenciaron tres genes virales a partir de las muestras positivas para tipificar los aislamientos. En el relevamiento efectuado, no se detectó CpGV en Mendoza ni en las regiones donde no se utilizó el virus. En cambio, las muestras de Catamarca y el Alto Valle (RN) revelaron la presencia de CpGV tanto en los lotes tratados como en montes aledaños, sugiriendo cierta capacidad de dispersión y permanencia del virus en el ambiente. En cuanto a la incidencia, se registraron grandes diferencias: mientras que en Catamarca los valores fluctuaron en torno al 40 – 50 %, en el Alto Valle estuvieron en un rango de 1 - 20 %. Al analizar las secuencias, se constató que las poblaciones de virus de ambas regiones son genéticamente distintas. En Catamarca predomina una variante que exhibe similitud con un

aislamiento poco virulento de CpGV originario de Irán, lo que explicaría los altos porcentajes de incidencia debido a la existencia de infecciones subletales y posible transmisión vertical. En tanto, el tipo recuperado en el Alto Valle (hallado también minoritariamente en Catamarca) se corresponde con el aislamiento mexicano de alta efectividad en el cual se basan los formulados comerciales del virus disponible en el país, por lo que disminuyen drásticamente las probabilidades de coleccionar larvas vivas portadoras del virus.

Desarrollo de un método para diferenciar a las especies de *Helicoverpa* presentes en Argentina. La certera identificación del insecto infectado es fundamental a la hora de estudiar las relaciones patógeno/hospedante. Las especies que conforman el complejo *Helicoverpa/Heliothis* (representadas en la zona núcleo sojera y maicera argentina principalmente por *Helicoverpa zea* y *Helicoverpa gelotopoeon*) pueden ser discriminadas mediante el análisis microscópico de la genitalia de machos adultos, pero son indistinguibles durante su fase larval. En nuestro país, a las polillas autóctonas mencionadas se sumó recientemente la exótica *H. armigera*, una de las plagas más devastadoras de la agricultura a nivel mundial. Por esta razón, se desarrolló una metodología de identificación rápida y efectiva basada en PCR-RFLP. Para ello, se diseñaron nuevos cebadores universales que amplifican el gen de la citocromo oxidasa I (COI) de todas las especies del complejo, para luego digerir el producto con una enzima de restricción que produce un patrón distintivo. El método fue validado en larvas y adultos de *Helicoverpa* spp. colectadas en diversos cultivos y zonas geográficas, cuya identidad fue doblemente corroborada por genitalia (en el caso de machos adultos) y secuenciación. Se obtuvieron las primeras secuencias de *H. armigera* en Argentina, reportándose la presencia de esta plaga en localidades del norte y centro del país. Asimismo, se anotaron secuencias de *H. gelotopoeon* (había solo una disponible hasta el momento) y *H. zea* provenientes de diferentes provincias.

Nuevo aislamiento baculoviral obtenido de *Helicoverpa gelotopoeon*. Se caracterizó un baculovirus obtenido a partir de larvas enfermas de la oruga bolillera *H. gelotopoeon*. El tamaño de los cuerpos de oclusión, de estructura poliédrica, osciló entre los 0,6 y 1,2 μm de diámetro. Los cortes ultrafinos de larvas inoculadas revelaron la presencia de cuerpos de oclusión en los núcleos de las células infectadas (principalmente en los cuerpos grasos), y la existencia de una única nucleocápside por envoltura lipoproteica. El baculovirus investigado pudo ser clasificado, entonces, como un nucleopoliedrovirus de nucleocápside simple (SNPV, por sus siglas en inglés). Exámenes histopatológicos mostraron la naturaleza poliorganotrópica de la infección: tejido graso, epidermis y matriz traqueal fueron colonizados por el virus. La alta infectividad del aislamiento quedó evidenciada mediante bioensayos con larvas neonatas de *H. gelotopoeon*, ya que la dosis letal para que el 50 % de los ejemplares

expuestos al virus muera resultó ser menor a 2 cuerpos de oclusión/larva. En cuanto al tiempo letal, el promedio de supervivencia luego de la inoculación fue de 4 días. Por su alta virulencia, el nucleopoliedrovirus aquí descrito (el primero en ser aislado de *H. gelotopoeon*) podría ser usado para desarrollar un bioinsecticida. Los estudios moleculares identificaron al virus como una variante *Helicoverpa armigera* SNPV. Se han reportado aislamientos de este virus a partir de *H. armigera* y *H. zea*, lo que hace suponer que la presente variante podría ser efectiva no solo para el control de *H. gelotopoeon*, sino también de otras especies del complejo. Esto refuerza la importancia del hallazgo y la necesidad de profundizar los estudios en vista de su futura aplicación.

Nuevo aislamiento baculoviral obtenido de *Chrysodeixis includens*. Se dilucidó la etiología de la enfermedad que ocasionó mortandad masiva en una cría de laboratorio de la “falsa medidora”. Mediante microscopía electrónica de barrido se observaron cuerpos de oclusión poliédricos de morfología heterogénea, con un diámetro variable entre 0,7 y 1,6 μm . La amplificación, la secuenciación y el análisis filogenético de tres genes conservados (poliedrina, *lef-8* y *lef-9*) permitieron identificar al patógeno, por primera vez en Argentina, como *Chrysodeixis includens* NPV. Su alta virulencia y la calidad de plaga del insecto hospedante (en especial en el norte argentino) animan a continuar investigando el potencial biocontrolador de este entomopatógeno.

Detección e identificación de microsporidios. Si bien no suelen ser empleados en programas de manejo integrado, a causa de su moderada virulencia (son comunes las infecciones subletales), a menudo ocasionan problemas en lepidópteros criados en laboratorio. Se reportó por primera vez la infección de larvas de *Epinotia aporema* por este tipo de entomopatógenos, y se describió minuciosamente una nueva especie de microsporidio muy frecuente en larvas de *Rachiplusia nu*, tanto de campo como de cría artificial: *Nosema rachiplusiae* sp. nov. (Arneodo y Sciocco, 2018). Esta especie presenta esporas diplocarióticas y de forma oval ($3.61 \pm 0.29 \times 1.61 \pm 0.14 \mu\text{M}$), con una pared compuesta de una exospora electrodensa y una endospora clara de cerca de 30 nm y 100-120 nm, respectivamente. Su filamento polar esta organizado en filas simples de 10 a 12 vueltas (moda: 11). Se localiza en el citoplasma de las células de los insectos, cerca del retículo endoplásmico (en especial los estadios tempranos). Produce una infección poliorganotrópica, con el cuerpo graso como el tejido más afectado, seguido por la matriz traqueal y la epidermis. Los estudios filogenéticos basado en las subunidades de ARN ribosomal pequeño (SSU) y grande (LSU) ubicaron claramente a la nueva especie dentro del clado “*Nosema bombycis*”; el aislamiento más cercano fue un microsporidio proveniente de una polilla asiática, *Philosamia cyntia*.

Publicaciones

- Arneodo, J.D.; Balbi, E.I.; Flores, F.M.; Sciocco-Cap, A. 2015. Molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliathinae) in Argentina and development of a novel PCR-RFLP method for its rapid differentiation from *H. zea* and *H. gelotopoeon*. *Journal of Economic Entomology* 108:2505-2510.
- Arneodo, J.D.; Dami, L.; Jakubowicz, V.; Alzogaray, R.A.; Taibo, C. 2018. First report of *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus (ChinNPV) infecting *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *Florida Entomologist* 101(3):515-516.
- Arneodo, J.D.; De Anna, J.; Salvador, R.; Farinon, M.; Quintana, G.; Sciocco-Cap, A. 2015. Prospection and molecular analysis of CpGV isolates infecting *Cydia pomonella* at different geographic locations in Argentina. *Annals of Applied Biology* 166:67-74.
- Arneodo, J.D.; Sciocco-Cap, A. 2018. Biological and molecular features of *Nosema rachiplusiae* sp. n., a microsporidium isolated from the Neotropical moth *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). *Parasitology Research* 117:1325-1331.
- Arneodo, J.D.; Taibo, C.; Sciocco-Cap, A. 2016. Light microscopy of microsporidian spores and baculovirus occlusion bodies in *Epinotia aporema* and *Helicoverpa gelotopoeon* larval tissues, respectively. *Revista Argentina de Microbiología* 48:358-359.
- Ferrelli, M.L.; Taibo, C.; Fichetti, P.; Sciocco-Cap, A.; Arneodo, J.D. 2016. Characterization of a new *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus variant causing epizootic on a previously unreported host, *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 138:89-93.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

- Proyecto PIP CONICET 114 201101 00306. Efecto de la dosis inicial y la edad de la larva al momento de la ingestión en la cinética del baculovirus EpapGV en *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae). 2012-2014.
- Proyecto Nacional de Biotecnología (PNBIO)-INTA 1131044. Genómica aplicada a estudios de ecología molecular y diversidad genética. 2013-2018.
- Proyecto Nacional de Biotecnología (PNBIO)-INTA 1131023. Prospección y caracterización funcional de genes de interés biotecnológico. 2013-2018.
- Proyecto PICT-2016-1949. Baculovirus que infectan *Helicoverpa* spp. y *Rachiplusia nu* (Lepidoptera): patogénesis comparada de virus específicos vs. generalista, interacciones en infecciones mixtas y caracterización de una nueva especie viral. 2017-2019.

Validación de estrategias de Manejo Integrado de carpocapsa en nogal: aplicaciones complementarias de granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV) con insecticidas ovicidas y larvicidas

Validation of IPM strategies for codling moth in walnut: complementary applications of *Cydia pomonella* granulovirus with ovicidal and larvicidal insecticides

Graciela Mabel Quintana^{1*}, Alberto Gómez², Carlos Flores², Arturo Sardá², Ricardo López³, Mariela Civale³, Evangelina Zembo³, Rubén La Rossa¹ y Juan José Cólica⁴

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Instituto de Sanidad y Calidad Agropecuaria Mendoza (ISCAMEN). Programa de Lucha contra Carpocapsa y Grafolita. ³Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Programa Nacional de Supresión de Carpocapsa. ⁴Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Catamarca. *quintana.graciela@inta.gov.ar

Cydia pomonella, carpocapsa o gusano de la pera y la manzana, es plaga clave de los cultivos de pepita y de nogal. Produce daños que ocasionan pérdidas en campo y en galpón y, por su carácter de plaga cuarentenaria, el rechazo de partidas en el mercado internacional. Tradicionalmente su control se basa en el uso de productos químicos convencionales (neurotóxicos) que ocasionan resistencia, riesgos para la salud humana y el ambiente y dejan residuos en frutos.

El control microbiano, y en particular el granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV) es una alternativa efectiva y selectiva para el control de la plaga. El virus ha sido ampliamente utilizado para el desarrollo de bioinsecticidas, su alta especificidad y eficacia, el escaso o nulo impacto sobre el medio y la ausencia de residuos en frutos lo han posicionado como uno de los agentes de control microbiano más exitosos del mercado mundial. En nuestro país, el INTA registró el primer insecticida biológico sobre la base del CpGV en el año 2000 (Registro SENASA, nro. 33531). El producto ha sido incorporado exitosamente en estrategias de manejo integrado de carpocapsa en pepita y nogal, ya sea en aplicaciones complementarias con productos químicos convencionales o usado como única herramienta. Para asegurar el uso sustentable del CpGV en el cultivo es deseable combinar su aplicación con insecticidas selectivos.

De modo paralelo, el impacto negativo de los productos convencionales, en particular del metilazinfos, ha motivado su restricción, favoreciendo el registro de nuevos insecticidas clasificados como de Riesgo Reducido o Alternativos a órganofosforados (OP). Estos productos alternativos actúan principalmente cuando las plagas ingieren el alimento o cuando el insecticida entra en contacto directo con los desoves. En la práctica, su uso demanda una

mayor precisión del momento de tratamiento y una mejor cobertura del follaje y frutos en comparación con la aplicación de insecticidas de amplio espectro.

El mercado local dispone de una amplia gama de formulados con diferentes principios activos registrados para el control de carpocapsa en los cultivos de pepita. Esto comprende desde productos convencionales basados en organofosforados y piretroides hasta productos alternativos como feromonas, kairomonas, virus entomopatógenos y reguladores de crecimiento, entre otros.

Pero, solo unos pocos de esos productos estuvieron o están registrados para usar en nogal: metil azinfos y fosmet (organofosforados); cypermctrina y lambdacialotrina (piretroides); un insecticida biológico, larvicida, basado en el CpGV y una formulación de feromonas sexuales (*puffer*) para emplear en técnica de confusión sexual (TCS). De estos insecticidas registrados, solo el virus y las feromonas son aptos para programas de MIP y, en general, son poco utilizados por los productores nogaleros, quienes de modo tradicional han recurrido a reiteradas aplicaciones de productos organofosforados y piretroides. Es indispensable ampliar la base de los insecticidas registrados en el país para el control de plagas claves y secundarias en nogal.

Así, los trabajos conducidos durante el proyecto tuvieron como objeto evaluar la eficacia de los insecticidas ovicidas y larvicidas metoxifenocide, spinetoram y rynaxypyr, en aplicaciones complementarias con CpGV para el control de carpocapsa en el cultivo de nogal, con el fin de alentar la ampliación de uso de estos productos y definir estrategias de uso sustentable del virus, de modo de evitar o demorar la expresión de resistencia.

Durante cuatro campañas consecutivas, entre 2013 y 2017, se condujeron ensayos en montes comerciales de nogal en fincas ubicadas en Andalgalá, Catamarca y en el Valle de Uco, Mendoza, para evaluar insecticidas de bajo riesgo, definir estrategias sustentables del virus y alentar la transición del sector nogalero hacia el MIP. Cabe aclarar que las investigaciones se desarrollaron en el marco del Programa Nacional de Supresión de carpocapsa (PNSC) del SENASA, junto con las EEA INTA Andalgalá en Catamarca y el ISCAMen y la EEA Tupungato, en Mendoza.

En Catamarca, los ensayos comprendieron aplicaciones complementarias de metoxifenocide, rynaxypyr y spinetoram con CpGV para el control de carpocapsa. El esquema planteado consideró las siguientes alternativas: a- el uso de los ovicidas metoxifenocide o spinetoram al inicio de las posturas durante la primera generación, seguidos de aplicaciones retardadas de los larvicidas CpGV o rynaxypyr a partir de los 350 carpogrados, para cubrir el período de mayor nacimiento de larvas, y hasta la cosecha. b- el uso de ambos larvicidas combinados: 1- Rynaxypyr sobre la primera generación seguido de aplicaciones de CpGV

sobre la segunda y la tercera generación. 2- CpGV sobre la primera y segunda generación seguido de aplicaciones de rynaxypyr sobre la tercera generación. c- el uso de los larvicidas sobre la primera y segunda generación, seguidas de aplicaciones de los ovicidas sobre las posturas de la tercera generación.

Los tratamientos se aplicaron en cobertura completa. Las aplicaciones se efectuaron desde mediados de noviembre hasta fines de enero o principios de febrero, según el producto o combinación evaluados. Como testigo se usaron lotes sin tratamiento.

Para el monitoreo se emplearon trampas cebadas con feromonas 1x (Tipo ISOMATE® 1X). Se registró el número de adultos capturados con una frecuencia de tres veces por semana. La fecha del inicio de los tratamientos se estableció próxima a la eclosión de los huevos de la primera generación, entre los 200 y 250 grados días (°D) post biofix.

Para el análisis, se registró el número de frutos dañados por carpocapsa en dos momentos: “a fin de primer vuelo” y “a cosecha”. Durante el primer monitoreo se inspeccionaron alrededor de 500 frutos con corte de 100. A cosecha se colectaron alrededor de 1000 frutos por tratamiento con corte de 200. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante una prueba de comparaciones múltiples para proporciones basada en tablas de contingencia 2xc con $\alpha=0,05$. Para ello se utilizó una macro diseñada para el paquete estadístico SAS®, denominada “compprop”.

Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas respecto del testigo sin tratar, que arrojó daños que oscilaron entre 9,7 y 38 %, en tanto que las combinaciones resultaron similares entre sí, sin evidencias de incompatibilidad con daño <1 % y equivalentes a los niveles de daño del tratamiento con virus como única herramienta, que oscilaron entre no detectable y <1 %.

El uso del granulovirus de *C. pomonella* en aplicaciones alternadas y complementarias con metoxifenocide, spinetoram o rynaxypyr fue muy promisorio en orden de evitar o demorar la expresión de resistencia al virus y alcanzar un control satisfactorio con mínimo impacto ambiental. Estos resultados le permitieron al sector privado alcanzar en 2014 la ampliación de uso de metoxifenocide, iniciar el registro de spinetoram y, a la vez, establecer antecedentes de la eficacia de rynaxypyr para el control de carpocapsa en el cultivo de nogal en la Argentina.

En Mendoza, de modo paralelo, las actividades estuvieron orientadas a la evaluación del virus, como única herramienta de control de carpocapsa o en aplicaciones complementarias del CpGV con metoxifenocide. A diferencia de Catamarca, estas aplicaciones del virus en nogal fueron las primeras realizadas en la provincia.

En la campaña 2013-2014, se condujeron ensayos en fincas nogaleras ubicadas en el Valle de Uco. Los tratamientos consideraron el uso del CpGV en cobertura completa sobre la

1.^a, 2.^a y 3.^a generación de carpocapsa, aplicado en intervalos de 10 días y en aplicaciones complementarias con metoxifenocida según el siguiente detalle: metoxifenocida sobre la 1.^a generación (dos aplicaciones) con intervalos de 14 días seguidos de CpGV sobre la 2.^a y la 3.^a generación y CpGV sobre la 1.^a y la 2.^a generación seguido de metoxifenocida (2 aplicaciones). Las aplicaciones se iniciaron a mediados de noviembre y finalizaron a inicios de febrero. En coincidencia con los resultados obtenidos en Catamarca, se observó un control altamente satisfactorio de la plaga –niveles de daño no detectables a cosecha– tanto cuando el virus se usó solo como cuando se complementó con metoxifenocida. Esto reconfirmó tanto el alto grado de eficacia del virus como de las aplicaciones combinadas con insecticidas selectivos. Se obtuvo un control satisfactorio de carpocapsa con mínimo impacto ambiental. Los tratamientos tampoco difirieron del testigo convencional.

En general, la estrategia adquiere relevancia cuando se considera que la producción nogalera está altamente concentrada en los alrededores de centros urbanos y en su mayoría, las fincas contienen la casa familiar, huertas, animales domésticos y de granja. La integración del control microbiano con nuevos insecticidas para el control de carpocapsa en nogal ha sido muy bien recibida por el sector y alienta la transición hacia el MIP en el cultivo.

Publicaciones

- Quintana, G.; Cólica, J.J.; Farinón, O.M.; La Rossa, F.R. Evaluación de la eficacia de los insecticidas metoxifenocida, rynaxypyr y spinetoram en aplicaciones combinadas con el granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV) para el control de carpocapsa, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera; Tortricidae), en nogal. RIA. (En revisión).
- Quintana, G. 2013. Incorporación del virus de la granulosis de *Cydia pomonella* (CpGV) en las estrategias de control de carpocapsa (*C. pomonella* L.) en montes de pepita y nogal en la Argentina. I Taller Argentino de Patologías de Insectos y sus Aplicaciones en Biocontrol. 16-17 de octubre de 2013. pp. 145-152. Mar del Plata, Buenos Aires.
- Quintana, G. 2015. Estrategias MIP en montes de nogal para el control de Carpocapsa. III Simposio internacional de nogalicultura del NOA. Recuperado de: <http://cfi.org.ar/wp-content/uploads/2015/05/estrategias-mip-en-montes-de-nogal-para-el-control-de-carpocapsa-quintana-graciela.pdf>

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA PNFRU 1105072. Generación y desarrollo de tecnología para minimizar el riesgo de introducción de plagas cuarentenarias ausentes y asegurar el manejo eficiente de plagas cuarentenarias presentes. 2013-2018.

Proyecto INTA CATRI 1233102. Aportes al desarrollo territorial de Andalgalá, Pomán y Tinogasta a partir de una nueva institucionalidad regional. 2013-2018.

Proyecto INTA MZASJ 1251205. Atención a las problemáticas de los nuevos modelos productivos del Valle de Uco. 2013-2018.

CAT INTA-ISCAMEN 23012. Desarrollo de estrategias MIP para el control de carpocapsa y grafolita en cultivos de pepita y nogal en Mendoza. 2014-2017.

CAT IMYZA-Arysta Life Science Argentina SA. Evaluación de nuevos aislamientos de CpGV para el control de carpocapsa en cultivos de pepita, nogal y carozo. 2013-2018.

Convenio de Desarrollo de Productos INTA-BILAB S.A. Evaluación de nuevos aislamientos de CpGV para el control de carpocapsa en cultivos de pepita, nogal y carozo. 2016-2017.

Estrategias MIP para el control de Carpocapsa en montes de nogal de pequeños productores de la provincia de Mendoza

IPM strategies for the control of codling moth in walnut orchards of small farmers in the Mendoza province

Graciela Mabel Quintana^{1*}, Alberto Gómez², Carlos Flores², Arturo Sardá², Federico Fuligna³, Omar Farinón¹ y Rubén La Rossa¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Instituto de Sanidad y Calidad Agropecuaria Mendoza (ISCAMEN). Programa de Lucha contra Carpocapsa y Grafolita. ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria (EEA) La Consulta. *quintana.graciela@inta.gob.ar

Hacia 2014, la superficie dedicada al cultivo de nogal en Mendoza se había extendido de modo notable y sostenido, ocupando el segundo lugar como productora de nuez a nivel nacional, con un 24 % del total del país y liderando las exportaciones. Un análisis del sector evidenció un bajo rendimiento promedio de frutos por hectárea debido a problemas de manejo sanitario, conducción y riego del cultivo, entre otros. Carpocapsa, plaga clave, era una limitante importante para la producción y su control convencional traía aparejado alto impacto ambiental. La adopción de estrategias de MIP ofrecía, *a priori*, respuestas al sector para salvar esta situación.

En 2014, en el marco de un convenio de asistencia técnica (SA23012) con ISCAMEN, se elaboró el proyecto denominado: “Transición hacia el Manejo Integrado de Plagas (MIP) en montes de nogal de pequeños productores de la provincia de Mendoza”. Este tuvo como finalidad favorecer la adopción de prácticas MIP que contemplaran el uso de innovaciones tecnológicas y herramientas alternativas al control químico convencional para alcanzar una producción sustentable de nuez de nogal de pequeños y medianos productores de la provincia de Mendoza.

Las actividades buscaron: modificar prácticas para alcanzar una protección aceptable del cultivo manteniendo la rentabilidad y la sustentabilidad; reducir los riesgos de la exposición a los plaguicidas de síntesis de amplio espectro y elevada toxicidad de los trabajadores agrícolas; disminuir el impacto de las prácticas sobre el ambiente e introducir el concepto de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).

Se consideró la incorporación de tácticas de control menos disruptivas de los enemigos naturales, combinando herramientas de control microbiano (CpGV), insecticidas reguladores de crecimiento (Metoxifenocida, Spinetoram) y Técnica de Confusión Sexual (TCS). El manejo

de la resistencia a insecticidas se basó en la alternancia, secuencia o rotación de insecticidas con diferente modo de acción.

Con el fin de brindar asistencia técnica para la toma de decisiones, se estableció un sistema de monitoreo de la dinámica poblacional de los adultos de carpocapsa. Se montó una red con trampas cebadas con feromonas/kairomonas, 174 en total, para vigilar la evolución del vuelo de los adultos y referenciarla a modelos de Grados Día, estimar la presión de plaga a nivel de parcela y evaluar la presencia de hembras oviplenas para decidir la oportunidad de inicio y continuidad de los tratamientos.

Para evaluar la marcha de las prácticas, se estimaron los daños en frutos en dos momentos: a fin de primer vuelo de carpocapsa y a cosecha.

Se seleccionaron un total de 10 parcelas, de las cuales 8 estarían destinadas a un manejo con insecticidas aptos para MIP, y 2 de ellas bajo la Técnica de Confusión Sexual. A su vez, para lograr una mayor cobertura territorial, las parcelas MIP-insecticidas fueron implementadas en los Departamentos de Tupungato, Tunuyán, San Carlos y San Rafael. En cada uno de estos Departamentos se consideraron dos parcelas en las que se aplicaron tratamientos que contemplaron el uso del virus sobre la primera generación seguido de aplicaciones del ovicida sobre la segunda y viceversa. Este esquema se completaba con aplicaciones del virus sobre la tercera generación y hasta cosecha.

Para la propuesta MIP-TCS se destinó una parcela bajo TCS para el Valle de Uco y otra para el Departamento de San Rafael, con aplicaciones complementarias de virus e insecticidas ovicidas para el control de la primera generación. Para el tratamiento de la segunda y tercera generación se consideró la oportunidad de aplicar los insecticidas de acuerdo con los niveles de capturas de adultos en trampas (sistema de alarma).

Para el inicio de los tratamientos se emitieron avisos de alertas diferenciados por zona y hospedero. Los avisos se difundieron por SMS, página web, correos electrónicos y panfletos entregados en finca. Con el fin de incorporar la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), adicionalmente se entregaron cuadernos de campo para registrar información sobre principios activos, fechas y frecuencias de los tratamientos fitosanitarios, registro de capturas, monitoreo general de las parcelas y de producción, entre otros.

Evaluación a fin de primer vuelo. Las parcelas con tratamientos MIP-Insecticidas no registraron diferencias significativas entre sí, ni con las testigo con manejo convencional. Los porcentajes de daño en fruto en planta variaron entre <1 % a no detectables. El daño de frutos en suelo por carpocapsa fue de 7 % y 10 % para tratamientos MIP-insecticidas y manejo convencional, respectivamente, las pruebas estadísticas aplicadas no arrojaron diferencias

significativas. Respecto de los daños en las parcelas MIP-TCS en el Valle de Uco, los daños en planta tendieron al 0 % y los detectados en piso alcanzó el 3 %.

Evaluación a cosecha. En los tratamientos MIP-insecticidas, no se registraron diferencias significativas entre las parcelas demostrativas y los controles. El análisis de daño en fruto arrojó valores entre 0,07 % y 0,32 %, respectivamente. En las parcelas MIP-TCS, los porcentajes de daño comercial en frutos mostraron diferencias significativas cuando se compararon con los observados en lotes con manejo convencional. El daño en las parcelas con confusión sexual varió entre 0,03 y 0,04 % frente al 1 % arrojado en las convencionales.

En resumen, se lograron niveles de control de carpocapsa semejantes y muy satisfactorios tanto en las parcelas que combinaron aplicaciones de insecticidas selectivos con CpGV como en las parcelas tratadas con insecticidas convencionales. La estrategia MIP evaluada permitió alcanzar un elevado control de la plaga con bajo o nulo impacto sobre el medio y la entomofauna benéfica, favoreciendo el uso sustentable del virus y de los insecticidas selectivos lo que evita o demora la expresión de resistencia en las poblaciones locales de la plaga. Asimismo, la TCS, como herramienta alternativa complementada con el virus y el producto larvicida, brindó un control efectivo. Su adopción permitiría ampliar el intervalo entre los tratamientos o disminuir las dosis de los insecticidas complementarios, reduciendo los costos del manejo sanitario al productor.

En todos los casos se observó un incremento de poblaciones de coccinélidos por lo que no fue necesario realizar tratamientos para el control de arañuelas ni pulgones, plagas secundarias del cultivo y habituales cuando se realizan aplicaciones con insecticidas organofosforados o piretroides.

El uso del cuaderno de campo tuvo un reconocimiento particular por parte de los productores, quienes valoraron contar con registros ciertos que les permiten optimizar el manejo sanitario y conocer el historial de la finca.

Los beneficios derivados de la adopción de las prácticas de MIP y del uso seguro de los insecticidas fueron difundidos y extendidos a productores, técnicos, trabajadores agrícolas y a su entorno a través de jornadas de campo, talleres y boletines de divulgación. Se creó un fuerte vínculo con el sector nogalero lo que se tradujo en la incorporación del ISCAMEN y del IMYZA en el clúster nogalero de la provincia como asesores y, además, la Ingeniera Agrónoma Graciela Quintana (IMYZA) como referente y miembro del Consejo Federal de Frutos Secos.

Publicaciones

Quintana, G. 2017. MIP de carpocapsa en nogal: incorporación del control microbiano. Virus de la granulosis de *Cydia pomonella*. IV Simposio Internacional de Nogalicultura. Expo productivo, 06-07 de agosto de 2017. Andalgalá, Catamarca.

Quintana, G. 2017. Control microbiano de carpocapsa: uso del virus de la granulosis (CpGV) para el control de carpocapsa (*Cydia pomonella* L.) en Argentina. Tercera Reunión del Consejo de Frutos Secos. Comisión de principios activos y de Mecanización. Estado del Manejo integrado de plagas en el cultivo del nogal. p. 6.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA PNFRU 1105072. Generación y desarrollo de tecnología para minimizar el riesgo de introducción de plagas cuarentenarias ausentes y asegurar el manejo eficiente de plagas cuarentenarias presentes. 2013-2018.

Proyecto INTA CATRI 1233102. Aportes al desarrollo territorial de Andalgalá, Pomán y Tinogasta a partir de una nueva institucionalidad regional. 2013-2018.

Proyecto INTA MZASJ 1251205. Atención a las problemáticas de los nuevos modelos productivos del Valle de Uco. 2013-2018.

CAT INTA-ISCAMEN 23012. Desarrollo de estrategias MIP para el control de carpocapsa y grafolita en cultivos de pepita y nogal en Mendoza. 2014-2017.

CAT IMYZA-Arysta Life Science Argentina S.A. Evaluación de nuevos aislamientos de CpGV para el control de carpocapsa en cultivos de pepita, nogal y carozo. 2013-2018.

Convenio de Desarrollo de Productos INTA-BILAB S.A. Evaluación de nuevos aislamientos de CpGV para el control de carpocapsa en cultivos de pepita, nogal y carozo. 2016-2017.

Desarrollo de una nueva formulación del granulovirus de *Cydia pomonella*: hacia la producción nacional

Development of a new formulation of *Cydia pomonella* granulovirus: towards domestic production

Graciela Mabel Quintana

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). quintana.graciela@inta.gob.ar

La preocupación creciente sobre el impacto ambiental y la sostenibilidad del uso de los productos químicos de síntesis ha demandado el desarrollo y uso de tecnologías alternativas para incorporar en las estrategias de MIP. Esta demanda se tradujo en un incremento de la participación de los bioinsecticidas en el mercado global de productos destinados al agro. En particular el control microbiano de insectos, a través del empleo de formulaciones basadas en virus, bacterias, hongos y nematodos, se posicionó como una alternativa segura y eficaz de control. En términos de valor, se espera que el mercado global de los bioinsecticidas supere los 6 mil millones de dólares hacia 2020, lo que representaría un incremento del 18,8 % desde 2015. Un indicador de esta tendencia es la progresiva participación de las grandes compañías del sector a partir de 2012, a través de adquisiciones de biofábricas, la participación en sociedades y la obtención de licencias para desarrollar y producir insecticidas biológicos.

En este sentido, los virus entomopatógenos, en particular los baculovirus, poseen un gran número de agentes con elevado potencial para el control seguro y eficaz de plagas. Una vez establecido el potencial del aislamiento de un baculovirus, es posible multiplicarlo, formularlo e incorporarlo en los programas sanitarios de los cultivos, utilizando los mismos canales de comercialización y maquinarias de aplicación empleados para los insecticidas químicos.

En el año 2000, luego de más de diez años de investigación y desarrollo, el INTA alcanzó el registro del primer insecticida biológico para el control de carpocapsa (*Cydia pomonella*), plaga clave de los cultivos de pera, manzana, nogal y membrillo. El producto, desarrollado a partir del virus de la granulosis de *C. pomonella* (CpGV), es altamente específico, inocuo para el hombre y los animales, la fauna auxiliar, abejas y plantas. No deja residuos tóxicos en frutos y ambiente.

Con este resultado el INTA presentó al sector agropecuario un insumo tecnológico sustancial para el desarrollo de la producción integrada u orgánica de frutales. La producción

convencional también se beneficiaba por el ingreso al mercado de un producto sustituto de las últimas aplicaciones de insecticidas que dejan residuos indeseables en la fruta.

Para la transferencia al sector productor, se convocó al sector privado para la producción y comercialización del formulado viral. Si bien la convocatoria fue amplia, no existían en el mercado empresas con infraestructura y conocimientos como para llevar a cabo la producción. Finalmente, la transferencia se concretó a través de la firma de un convenio con una empresa francesa (Natural Plant Protection –ex Calliope– Arysta LifeScience S.A.) para la producción y un acuerdo de asistencia técnica con una empresa local para su comercialización (Agro Roca S.A.).

Desde el inicio, estas alianzas estratégicas tuvieron un marcado componente de investigación adaptativa y de extensión. La cooperación se tradujo en una exitosa incorporación del insecticida en la producción orgánica de estos frutales y en la ampliación de uso al cultivo de nogal. Asimismo, fue favorable en la evaluación de nuevos productos que colaboren con el uso sustentable del virus y el establecimiento de estrategias seguras y eficaces, que eviten o demoren la expresión de resistencia.

En la actualidad, hay un marcado interés por parte de los productores de pera, manzana, nogal y membrillo de las diferentes regiones para incorporar de manera efectiva el virus. Pero dicha incorporación se ve limitada por el costo elevado del formulado, que aún continúa produciéndose en Francia, como así también por la falta de nuevos insumos biológicos que brinden soluciones integrales al manejo sanitario de los cultivos.

La comercialización de nuevos formulados con base en el CpGV en el mercado local ha agregado un nuevo obstáculo en la comercialización eficiente y rentable del producto. Pero, sin dudas, el hecho de tener que importar el producto licenciado por INTA lo torna menos competitivo aún.

Del análisis de los resultados obtenidos, que comprenden aspectos técnicos y económicos, surgió la conveniencia de trabajar en el desarrollo de una nueva formulación y el diseño y establecimiento de una planta de producción nacional de insecticidas virales. Esto permitiría sustituir la importación actual y contar con un producto más económico para ofrecer al productor.

La línea de investigación encarada en el proyecto tuvo por objetivo el desarrollo de una nueva formulación a partir de la producción masiva del virus. Dado que la multiplicación se realiza *in vivo* sobre larvas de carpocapsa, se incrementó la cría de carpocapsa de laboratorio, que se conduce en el IMYZA desde hace más de veinte años. Esto permite contar hoy con insectos sanos y en número suficiente para la multiplicación del virus.

Para el desarrollo de una formulación se replanteó y analizó un nuevo escenario de cooperación con el sector privado. Este replanteo permitió no solo continuar la labor desarrollada con el CpGV, sino también definir nuevos agentes de control microbiano objeto de desarrollo. Se ha originado un convenio de transferencia de tecnología con diez años de vigencia para la puesta a punto de la producción comercial de una nueva formulación.

El proyecto prevé, así también, la instalación de una planta piloto, la asistencia a la empresa para el diseño, la instalación y la puesta en marcha de la planta, el ajuste de la metodología de producción y el diseño conjunto de nuevas presentaciones de la formulación. De modo paralelo, se asiste para el registro ante SENASA y se conduce la evaluación en campo. A la fecha, se cuenta con dos nuevos preparados de CpGV que están siendo evaluados en campo.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA MZASJ 1251205. Atención a las problemáticas de los nuevos modelos productivos del Valle de Uco. 2013-2018.

Convenio de Cooperación Institucional con el Programa Nacional de Supresión de carpocapsa (PNSC) del SENASA (23102). Evaluación, desarrollo y transferencia de estrategias de manejo integrado de plagas alternativas al uso de insecticidas convencionales para el control de carpocapsa y grafolita en cultivos de nogal, pepita y carozo de las diferentes regiones productoras del país. Coordinación. 2014-2019.

CAT INTA-ISCAMEN 23012. Desarrollo de estrategias MIP para el control de carpocapsa y grafolita en cultivos de pepita y nogal en Mendoza. 2014-2017.

CAT IMYZA-Arysta Life Science Argentina S.A. Evaluación de nuevos aislamientos de CpGV para el control de carpocapsa en cultivos de pepita, nogal y carozo. 2013-2018.

Convenio de Desarrollo de Productos INTA-BILAB S.A. Transferencia de conocimientos y tecnologías para contribuir al desarrollo de productos biológicos y su futura producción y comercialización. Acta complementaria para el desarrollo nacional del virus de *Cydia pomonella*. 2016-2026.

Clones recombinantes de *Bacillus thuringiensis* que expresan proteínas Cry individuales

Recombinant clones of *Bacillus thuringiensis* that express individual Cry proteins

Diego Sauka^{1,2*}, María Inés Onco^{1,2}, Melisa Pérez^{1,2}, Nanci López¹, Marcelo Berretta^{1,2} y Graciela Benintende¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*sauka.diego@inta.gob.ar

Bacillus thuringiensis es una bacteria entomopatógena que produce inclusiones cristalinas durante la esporulación, constituidas generalmente por una combinación de más de una proteína Cry distinta. Este grupo de proteínas constituye sus principales factores de virulencia. Los cristales ejercen su actividad insecticida cuando son ingeridos por vía oral, son solubilizados y sus toxinas activadas en el intestino medio del insecto susceptible.

La aplicación de *B. thuringiensis* se realiza principalmente como formulado a base de un complejo spora-cristal o como parte de organismos genéticamente modificados (por ej. plantas Bt) capaces de expresar las toxinas mencionadas. Para un uso eficiente de las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* como parte de estos mismos es importante conocer cuáles de estas proteínas presentan la toxicidad más elevada para una plaga blanco y cómo interactúan cuando se las aplica simultáneamente. Es también de interés analizar el potencial de mezclas de proteínas insecticidas para reducir o retrasar la selección de insectos resistentes a proteínas individuales a partir del conocimiento de su interacción con los receptores en el insecto. Para todos estos estudios es imprescindible clonar sus genes respectivos en un principio y expresarlos individualmente.

Para la expresión de proteínas Cry se pueden emplear sistemas de expresión, tanto procariotas como eucariotas. En el primer caso, se utilizan vectores plasmídicos para su expresión en *Escherichia coli* y también en cepas acristalíferas de *B. thuringiensis*. En el segundo caso, se utilizan vectores de baculovirus para expresar las proteínas Cry en células de insectos.

En este estudio se realizó el clonado y expresión de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa* y *cry2Ab* provenientes de las cepas de *B. thuringiensis* INTA TA21-2, INTA H48-5, HD-73 svar. *kurstaki*, INTA H42-1 e INTA TA24-6 respectivamente, en la cepa acristalífera de *B. thuringiensis* 4Q7.

En primer lugar, se amplificó mediante *hot start* PCR los genes *cry* mencionados de forma completa. Se utilizaron un par de cebadores que contienen en sus extremos sitios de restricción para el clonado correcto en el vector plasmídico pSVP27. Este vector tiene la particularidad de replicar tanto en *E. coli* como en *B. thuringiensis*. Los amplicones generados y el vector fueron digeridos con *Bam*HI y *Sph*I para permitir la ligación. Se transformaron los productos de la ligación por electroporación en la cepa XL-1 de *E. coli*. Entonces se extrajo el DNA plasmídico de los clones recombinantes y se transformó en 4Q7. La identidad de cada gen *cry* clonado se corroboró mediante PCR con cebadores específicos para cada gen y del vector, y secuenciación de sus amplicones. Se analizó la expresión mediante microscopía óptica de contraste de fases en cultivos completamente esporulados de los clones seleccionados, identificándose la presencia de cristales libres muy pequeños. Las bandas esperadas de ca. 130 o 65 kDa correspondientes a *Cry1* y *Cry2* respectivamente, con excepción de las que brindó el clon que expresa *Cry1Ac*, no se detectaron en los geles de SDS-PAGE. Para terminar, se comprobó la actividad insecticida de los clones recombinantes obtenidos para larvas neonatas del lepidóptero *Cydia pomonella* mediante bioensayos de incorporación en dieta (1000 µg biomasa seca/ml de dieta). Además, se determinó la patogenicidad para larvas de *Aedes aegypti* de los clones transformados con *cry2Aa*. Los clones estudiados fueron responsables de altos porcentajes de mortalidad, con excepción de los transformados con *cry2Ab*, que no demostraron actividad insecticida alguna.

Para concluir, se consolidó en el laboratorio una estrategia para el clonado y expresión individual de genes *cry* en *B. thuringiensis*. Los clones recombinantes obtenidos expresarían sus proteínas *Cry* respectivas debido a que mostraron estructuras similares a cristales tras la esporulación; en algunos se detectó la banda de peso molecular esperado en los geles de SDS-PAGE, pero sobre todo porque sus proteínas causaron mortalidad o alteraron significativamente el crecimiento de *C. pomonella*. Esta premisa se refuerza particularmente en aquellos clones que expresarían *Cry2Aa*, ya que, además, causaron mortalidad en larvas de *A. aegypti*. Los clones recombinantes obtenidos se podrían incluir en estudios de tamizaje de proteínas *Cry* con alta actividad insecticida en aquellas especies en las que no se conoce su grado de virulencia, e incluir en estudios que analicen la interacción entre sus toxinas y receptores correspondientes.

Publicaciones

Onco, M. 2018. Estudio de la toxicidad de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* como herramienta para optimizar el manejo de lepidópteros plaga de importancia agroeconómica. Tesis Doctoral, Facultad de Agronomía, UBA.

Onco, M.; Sauka, D.; Berretta, M.; Pérez, M.; López, N.; Benintende, G. 2018. Clonado y expresión de genes *cry* bajo el control de un promotor dependiente de esporulación en una cepa acristalífera de *Bacillus thuringiensis*. IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental y I Jornada de Microbiología General. Mar del Plata.

Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con alta actividad insecticida para larvas de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae)
Selection of highly active *Bacillus thuringiensis* strains against *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae

Diego Sauka^{1,2*}, María Inés Onco^{1,2}, Melisa Pérez^{1,2}, Nanci López¹ y Graciela Benintende¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*sauka.diego@inta.gob.ar

El control de *Cydia pomonella*, plaga principal de frutales de pepita, se basa principalmente en el empleo de insecticidas químicos con los riesgos ambientales que acarrear. Tecnologías que contengan *Bacillus thuringiensis* como base constituyen un complemento eficaz y seguro para su control, por su toxicidad selectiva alta e impacto casi nulo que generan en los ecosistemas. La característica principal de esta bacteria es que produce cuerpos cristalinos constituidos por proteínas Cry durante la esporulación, y en algunos casos también Cyt, que resultan tóxicos para larvas de insectos cuando estos son ingeridos. Además, puede secretar otros factores de virulencia durante la fase vegetativa de crecimiento que le confieren capacidad de multiplicarse en el huésped y producir septicemia.

El objetivo de este estudio fue seleccionar y caracterizar cepas nativas de *B. thuringiensis* con alta actividad insecticida para larvas neonatas de *C. pomonella*. La importancia de un estudio de este estilo radica en que las cepas de *B. thuringiensis* para evaluar son propias del ecosistema argentino, una situación que no acontece al emplear cepas exóticas para el control de insectos plaga, ya que, en muchos casos, estas responderían a condiciones existentes en el ambiente del que fueron aisladas. Por ello, era de esperar que este estudio permitiese la selección de cepas nativas con cualidades destacadas desde el punto de vista de lo esperado para un bioinsecticida eficiente para el control de *C. pomonella*.

Se determinó la patogenicidad de 73 cepas nativas de *B. thuringiensis* mediante bioensayos "burdos" utilizando una concentración final de biomasa (mezcla de esporas y cristales) de 5 µg/ml de dieta utilizando larvas neonatas de *C. pomonella*. En general, los resultados mostraron un nivel variable de toxicidad frente a dicha plaga. Se registraron mortalidades comprendidas de 0 % a 95,8 %. Se obtuvieron 9 cepas nativas que demostraron una mortalidad menor al 30 %, 3 entre 30 y 50 %, y 61 mayor al 50 %. Las cinco cepas nativas que resultaron ser las más tóxicas para *C. pomonella* fueron *B. thuringiensis* INTA H12-5, INTA Mo1-7, INTA 54-8, INTA L93-3, e INTA H42-1, con mortalidades comprendidas entre el

95,8 % y el 89,6 % respectivamente. Se identificaron en ellas cristales bipiramidales y cúbicos bajo microscopio de contraste de fases. Se observaron bandas de ca. 130 y 65 kDa mediante SDS-PAGE, asociadas a la morfología de cristales y consistentes con la presencia de genes *cry1* y *cry2* detectados a través de PCR. Por la misma metodología se descartó la presencia del gen *thuE*, sugiriendo que no producirían β -exotoxina. Todas mostraron perfiles electroforéticos de REP-PCR idénticos y perfiles plasmídicos similares a los de la cepa serovar *kurstaki* HD-1. Ciertas diferencias empezaron a aparecer cuando se analizaron los perfiles de genes de toxinas insecticidas presentes en estas cepas. *B. thuringiensis* INTA L93-3 e INTA Mo1-7 por un lado, y *B. thuringiensis* INTA 54-8 e INTA H12-5 por otro, presentaron perfiles similares que se diferenciaron por la ausencia de *cry1Ab* en las últimas dos cepas. *B. thuringiensis* INTA H42-1 presentó un perfil génico atípico no descrito previamente (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* y *cry2Aa*). Para finalizar, se cuantificó la virulencia estimando valores de CL₅₀. INTA H12-5 (CL₅₀=1,2 µg de biomasa/ml dieta) resultó ser la más tóxica. No existieron diferencias significativas entre los valores obtenidos para todas las cepas. Por todo lo expuesto, *B. thuringiensis* INTA H12-5 podría considerarse como ingrediente activo de un formulado de alta toxicidad para *C. pomonella* de aplicación regional. Otra cepa para tener en cuenta podría ser *B. thuringiensis* INTA H42-1, debido a produjo una toxicidad similar a la de HD-1 y a las variaciones en su perfil génico de toxinas insecticidas.

Publicaciones

- Onco, M. 2018. Estudio de la toxicidad de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* como herramienta para optimizar el manejo de lepidópteros plaga de importancia agroeconómica. Tesis Doctoral, Facultad de Agronomía, UBA.
- Onco, M.; Sauka, D.; Pérez, M.; Benintende, G. 2015. Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* para larvas de la polilla del manzano. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires. 2015.

Aislamiento y caracterización de nuevos aislados de *Bacillus thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas de carpocapsa

Isolation and characterization of new *Bacillus thuringiensis* isolates from live and healthy larvae of carpocapsa

Diego Sauka^{1,2*}, María Inés Onco^{1,2}, Melisa Pérez^{1,2}, Nanci López¹ y Graciela Benintende¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*sauka.diego@inta.gob.ar

Bacillus thuringiensis es la bacteria entomopatógena más estudiada y utilizada en el mundo como agente de control microbiano. Se caracteriza por sintetizar factores de virulencia que se conglomeran en inclusiones cristalinas parasporales (proteínas Cry/Cyt) durante la fase de esporulación. Asimismo, puede secretar metabolitos insecticidas durante su fase vegetativa de crecimiento, los que son activos *per se* o pueden contribuir sinérgicamente a la toxicidad global de la cepa en estudio.

Durante los últimos años, se han establecido en distintas partes del mundo colecciones de *B. thuringiensis* con la finalidad de encontrar nuevas cepas productoras de factores de virulencia que posean mayor poder insecticida o tóxicas para insectos en los que no se ha reportado actividad. Esta bacteria se ha aislado a partir de muestras de suelos, filoplano de plantas, residuos de la molienda de granos, telarañas, e incluso larvas de insectos muertos o enfermos. Sin embargo, el aislamiento de *B. thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas ha sido muy poco explorado. En el presente estudio se describe el aislamiento y caracterización fenotípica y genotípica de nuevos aislados de *B. thuringiensis* obtenidos a partir de larvas vivas y sanas de la comúnmente conocida carpocapsa o polilla del manzano (*Cydia pomonella* L. [Lepidoptera: Tortricidae]).

Se realizaron aislamientos a partir de 32 larvas vivas y sanas provenientes de distintas fincas radicadas en Tunuyán (Mendoza) y en el Alto Valle (Río Negro), libres de la aplicación de *B. thuringiensis*. A partir de tres de ellas, se obtuvieron 8 aislamientos que fueron identificados por la presencia de cristales parasporales y análisis de un fragmento del gen 16S rRNA, dejando claro que el aislamiento de *B. thuringiensis* a partir de este tipo de muestras es totalmente factible. Se individualizaron cristales ovoides mediante microscopía de contraste de fases en todos ellos. Su análisis mediante SDS-PAGE brindó la existencia de una banda principal de ca. 130 kDa en la mayoría de estos, mientras que en otros, de ca. 180 kDa. Posteriormente se procedió a la detección de genes que codifican proteínas tóxicas para

lepidópteros, coleópteros y dípteros, y de genes asociados a la síntesis de β -exotoxina y zwittermicina, mediante amplificación génica (PCR). Se obtuvo ausencia de amplificaciones para los genes estudiados en todos los aislamientos, con excepción de la detección de genes *cry8* en todos los aislamientos de la muestra L276. Paralelamente, los nuevos aislamientos se analizaron mediante Rep-PCR; lo que permitió que estos se agruparan dentro de uno de dos perfiles electroforéticos distintivos. Se evidenciaron 18 bandas polimórficas en ellos. El perfil de uno de estos grupos se asemejó al de la cepa coleopterica DSM2803 utilizada como referencia.

Finalmente se evaluó la patogenicidad de los nuevos aislamientos utilizando larvas de lepidópteros (*C. pomonella*), coleópteros (*Alphitobius diaperinus*) y dípteros (*Aedes aegypti*). Ninguno de los aislamientos nativos resultó significativamente tóxico para *C. pomonella* ni *A. diaperinus*. Mostraron un nivel de actividad insecticida nulo a leve, reportando mortalidades comprendidas entre el 0,0 % y el 10,4 % para *C. pomonella* y entre el 2,1 % y el 12,5 % para *A. diaperinus*. Estos niveles de toxicidad para *C. pomonella* eran esperables, ya que los aislamientos provinieron de larvas vivas y sanas de la misma especie donde se evaluó su patogenicidad. Por una parte, se podría hipotetizar que estos *B. thuringiensis* se encontraban en las larvas de donde se aislaron como saprófitos, y llegaron a ellas por estar en contacto con sus esporas libres o contenidas en su alimento habitual. En cambio, la baja toxicidad obtenida para *A. diaperinus* se pudo correlacionar con los aislamientos obtenidos de la muestra L276 con la presencia de un cristal ovoide asociado a una proteína de ca. 130 kDa, genes *cry8* y un perfil de Rep-PCR similar al de una cepa coleopterica. Por otra parte, ninguno de los aislamientos tampoco produjo mortalidad, ni ningún efecto visible, en larvas de *A. aegypti*. Teniendo en cuenta que en los aislamientos no se detectaron genes de toxinas insecticidas asociadas con actividad dipterica, era de esperar que estos no sean activos. Las proteínas Cry8 se han reportado como tóxicas para coleópteros, por ejemplo, para *Anthonomus grandis*, y en particular, para ciertos miembros de la familia Scarabaeidae, y para algunos lepidópteros como *Anticarsia gemmatilis*. Por lo tanto, los aislamientos INTA L276-1, INTA L276-5, INTA L276-9, INTA L276-10, INTA L276-11 podrían ser tóxicos para otras especies de coleópteros que no han sido aún evaluadas (por ejemplo, especies de escarabeídos). No obstante, para descartar o confirmar una actividad insecticida importante por parte de estos aislamientos nativos nuevos sería necesario realizar nuevos bioensayos donde se enfrenten estos y larvas de insectos pertenecientes a otras especies de los órdenes estudiados, incluso larvas de otros Filo como el Nematoda.

Publicaciones

- Sauka, D.; Pérez, M.; Lopez, N.; Onco, M.; Berretta, M.; Benintende, G. 2014. G. PCR-based prediction of type I β -exotoxin production in *Bacillus thuringiensis* strains. *Journal of Invertebrate Pathology* 122: 28-31.
- Onco, M. 2018. Estudio de la toxicidad de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* como herramienta para optimizar el manejo de lepidópteros plaga de importancia agroeconómica. Tesis Doctoral, Facultad de Agronomía, UBA.
- Sauka, D.; Onco, M.; Pérez, M.; López, N.; Berretta, M.; Benintende, G. 2014. Rápida predicción de la producción de β -exotoxina de tipo I en *Bacillus thuringiensis* mediante amplificación génica. XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Córdoba.
- Sauka, D.; López, N.; Berretta, M.; Benintende, G. 2015. Predicción de la producción de zwittermicina A en *Bacillus thuringiensis* a través de amplificación génica de *zmaA* y *zmaC*. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires.
- Onco, M.; Sauka, D.; Pérez, M.; Benintende, G. 2015. Larvas de *Cydia pomonella* como fuente de aislamiento de *Bacillus thuringiensis*. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires.

Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad nematocida

Native strains of *Bacillus thuringiensis* with nematocidal activity

Diego Sauka^{1,2*}, Mariano Maestro¹, Melisa Pérez^{1,2}, María Inés Onco^{1,2}, Nanci López^{1,2} y Graciela Benintende¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*sauka.diego@inta.gob.ar

La horticultura es una actividad de gran relevancia, tanto económica como social. Es afectada por diversas plagas (enfermedades, malezas, artrópodos), siendo los nematodos endoparásitos una de las que produce daños más importantes al sector. Las larvas de estos nematodos son de hábito subterráneo y se alimentan de las raíces de plantas. Si bien en nuestro país la información existente sobre los efectos dañinos causados por nematodos es fragmentada y relacionada con situaciones puntuales, esta pone en evidencia los perjuicios económicos de estos nematodos sobre la actividad. *Meloidogyne* spp. y *Nacobbus aberrans* ocasionan importantes daños en la producción de tomate y papa en Argentina, a la vez que se presentan como plagas de numerosas especies cultivadas por su carácter polifitófago. La rotación de cultivos, la enmienda orgánica y la aplicación de nematocidas químicos son las principales tácticas que se emplean para su control. El pensar que la solución para estas plagas esté basada solamente en ellas sería un desacierto. Se debe implementar una estrategia donde distintas tácticas de control (cultural, físico-mecánico, fitotécnico, químico racional y biológico) se amalgamen para lograr, tanto la reducción poblacional esperada como para impedir el avance a regiones no deseadas. Por ello, sería de gran utilidad disponer de una herramienta complementaria o alternativa para el control de nematodos endoparásitos que carezca de efectos no deseados sobre el ambiente. En este contexto, el desarrollo de un bionematocida bacteriano que contengan a *Bacillus thuringiensis* como ingrediente activo suena muy atractivo.

Si bien esta bacteria es reconocida principalmente por su actividad insecticida para diversas plagas, se han descrito en bibliografía la existencia de ciertas cepas que presentan actividad nematocida. Su mecanismo de acción principal es ejercido a través de la ingestión de proteínas Cry específicas que resultan en intoxicación, daño intestinal y la consecuente muerte del nematodo. La β -exotoxina que pueden producir algunas cepas, un metabolito termoestable con actividad tóxica inespecífica para insectos y células de mamíferos, que

actuaría inhibiendo la RNA polimerasa por competencia con el ATP por sitios de unión, también ha sido asociado con dicha actividad.

El objetivo general del presente trabajo fue seleccionar cepas nativas de *B. thuringiensis* con actividad nematocida. Larvas del nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* fueron utilizadas como modelo para la evaluación de la actividad nematocida de *B. thuringiensis*, debido a que su cría en laboratorio es simple y de bajo costo. Las cepas de *B. thuringiensis* en estudio fueron cultivadas sobre placas de agar BM hasta esporulación completa. A continuación, unas 5000 larvas de *P. redivivus* se dispersaron sobre la placa que contenía la cepa para estudiar. Todo este procedimiento se realizó al menos por duplicado. Se calculó el porcentaje de mortalidad contando las primeras 20 a 50 larvas observadas bajo microscopio óptico (100 x) después de 24 h de incubación a 25 °C. Se analizaron 54 cepas nativas pertenecientes a la colección del IMYZA-INTA. Por una parte, se utilizó la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* como control negativo y placas de agar BM solo con nematodos como control de viabilidad. Se obtuvieron 52 cepas que no mostraron actividad o demostraron una mortalidad ≤ 25 %, 1 entre 25-75 %, 1 mayor al 75 %. Por otra parte, la mortalidad natural en los controles nunca superó el 5 %. Dentro del primer grupo (mortalidad ≤ 25 %), no se hallaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos y la mortalidad del control negativo (cepa HD-1: sin actividad nematocida). Esto mismo denotaría cierta actividad nematocida basal cuando *P. redivivus* es expuesto a concentraciones elevadas de *B. thuringiensis*. Por una parte, las cepas nativas INTA H48-5 (productora de β -exotoxina) y Mo14-4 (catalogada con anterioridad como "no tóxica" para insectos) presentaron mayor actividad nematocida sobre *P. redivivus* con mortalidades del $53,7 \pm 1,3$ % y $98,7 \pm 0,7$ % respectivamente.

Por otro lado, se realizaron ensayos de quimiotaxis entre las cepas nematocidas de *B. thuringiensis* seleccionadas, y entre estas y la cepa HD-1. Las cepas para evaluar se cultivaron durante 24 h a 29 °C sobre extremos opuestos de placas de agar nutritivo. Entre medio de ambas se dispuso una alícuota con alta concentración de *P. redivivus*. Tras 24 h de incubación a temperatura ambiente se calcularon índices de quimiotaxis (IQ) con el objeto de observar si *P. redivivus* presentaba movimiento preferencial hacia alguna de las cepas nematocidas estudiadas. Se obtuvieron para los enfrentamientos entre HD-1 e INTA Mo14-4, y HD-1 e INTA H48-5 valores de IQ de 0,79 para ambos casos. Por un lado, estos resultados sugieren que los nematodos prefirieron a las cepas nematocidas como fuente alimenticia. Posiblemente INTA Mo14-4 e INTA H48-5 producirían algún tipo de attractante que no produzca HD-1. Por otro lado, cuando se enfrentaron ambas cepas nematocidas, *P. redivivus*

eligió indistintamente a una u otra cepa como alimento. Esto se pudo ver reflejado en el valor de IQ de prácticamente 0 (IQ= -0,07) obtenido.

De acuerdo con nuestro conocimiento, estos estudios representan los primeros reportes de cepas nativas de *B. thuringiensis* con actividad nematocida. La evaluación exitosa de la misma frente a nemátodos endoparásitos será determinante en cuanto a la posibilidad de la inclusión de alguna de las cepas seleccionadas como ingrediente activo de un bionemático.

Publicaciones

Sauka, D.; Maestro, M.; Benintende, G. 2016. Primer reporte de cepas argentinas de *Bacillus thuringiensis* con actividad nematocida. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, Santa Fe.

Aislamiento, selección y estudio de hongos con capacidad nematocida para ser empleados como agentes de control biológico de nematodos plaga

Isolation, selection and study of fungi with nematocidal activity to be employed as biological control agents for nematode pests

Mariano Maestro

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). maestro.mariano@inta.gob.ar

Los nematodos fitoparásitos dañan las raíces y modifican sus funciones limitando la absorción de agua y nutrientes causando un desarrollo inadecuado de la planta y aumentando su vulnerabilidad frente a virus, bacterias y hongos. La coocurrencia con estos patógenos hace que el daño causado por nematodos sea con frecuencia subestimado, pero se lo estima entre el 10 y 15 % de la producción agrícola mundial, e incluso más en cultivos de invernáculo.

Estas plagas pueden ser manejadas por medios químicos y culturales. Sin embargo, las alternativas culturales no son practicables en muchos casos, y se recurre a los químicos. Para ser efectivos, los nematocidas químicos deben inyectarse en el suelo y ser tóxicos a bajas concentraciones, lo que presenta un desafío con respecto a su permanencia y efectos en la salud y el ambiente. El Oxamyl (Vydate®), por ejemplo, puede ser aplicado en el suelo o en las hojas, y se transloca a las raíces, lo que lo hace adecuado como nematocida. Sin embargo, es altamente tóxico y está clasificado como "Altamente Peligroso" por la Organización Mundial de la Salud, junto con el Fenamiphos (Rubicon®), el Cadusafos (Rugby®) y el Carbofuran (Furadan®); estos están prohibidos o restringidos en EE. UU. y en la Unión Europea. Esto no pretende ser una lista del estado de los nematocidas químicos, sino ilustrar los actuales parámetros de bioseguridad de estos destinos de exportación de la producción agrícola argentina. Adicionalmente, con casi tres millones de hectáreas de agricultura orgánica, nuestro país es el segundo productor mundial después de Australia, y el sector está creciendo rápidamente impulsado por la demanda internacional centrada principalmente en los países desarrollados. Es necesario, por lo tanto, desarrollar estrategias adecuadas para el manejo de plagas que permitan al país afianzarse en este mercado.

Entre las alternativas, el biocontrol es una de las menos exploradas y con mayor potencial de desarrollo. Actualmente diversos países están estudiando el uso de hongos nematófagos como agentes de control, principalmente *Arthrobotrys* spp. Estos son hongos del

suelo, con capacidad de capturar y digerir nematodos. En condiciones naturales, establecen simbiosis con las plantas, colonizando la rizósfera y protegiendo las raíces de parásitos a la vez que los usan como fuente de nutrientes. El objetivo de esta línea de investigación fue seleccionar variedades de hongos con buena respuesta nematocida, capaces de colonizar el suelo rápidamente, que puedan producirse a bajo costo, y que resistan el almacenamiento durante un tiempo suficiente como para ser nematocidas viables.

Arthrobotrys oligospora posee estas características. Se obtuvieron 30 aislamientos de *A. oligospora* a partir de muestras de suelo de huertas orgánicas de las provincias de Buenos Aires y Córdoba. Estas fueron incorporadas al cepario del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del IMYZA y evaluadas con respecto a los criterios mencionados.

Los objetivos cumplidos se resumen a continuación:

-Se establecieron crías de los nematodos *Panagrellus redivivus* y *Meloidogyne javanica* para su uso en bioensayos.

-Se seleccionó un aislamiento nativo (AO3.10) con capacidad de reducir en 24 h hasta el 90 % de poblaciones de nematodos *in vitro*. Esta mortalidad y velocidad de respuesta son fundamentales para prevenir el daño a la raíz.

-Se evaluaron diversos sustratos sólidos y líquidos, y se desarrolló un medio de cultivo apto para producción en fermentador. Este emplea sacarosa como fuente de carbono y subproductos del extrusado de maíz como fuente de aminoácidos y vitaminas, además de macro y micronutrientes adicionales. Su importancia radica en que el medio líquido es más económico y fácilmente escalable que otras alternativas, y estos ingredientes no son particularmente costosos. Esto soluciona una de las limitantes más frecuentes en el uso de hongos como biocontroladores, que es el costo de producción.

-Se evaluó a AO3.10 respecto a su capacidad de colonización y permanencia en el suelo, siendo reaislado exitosamente un mes después de inoculado. Se probó su capacidad de persistir frente a estrés abiótico físico (movimiento del suelo) e hídrico (falta de irrigación). Dado que *A. oligospora* se reproduce tanto mediante esporas como de fragmentos de micelio, el movimiento del suelo no solo no lo afectó negativamente, sino que favoreció su dispersión. El hongo fue reaislado con éxito dentro del período ensayado (luego de dos semanas sin riego a 25 °C).

-Se evaluó la estabilidad de un formulado experimental de AO3.10. Permaneció viable y mantuvo su capacidad nematocida y colonizadora durante tres meses a temperatura ambiente, y al menos durante un año conservado a 6 °C. Este conocimiento es fundamental para su almacenamiento y distribución, previo a su uso en el campo.

Queda pendiente para su realización en un futuro cercano, la evaluación en el campo de la capacidad del aislamiento AO3.10 para reducir el daño causado por nematodos. Se estudiarán sus efectos en cultivos de invernáculo de producción orgánica (tomates), debido a su importancia comercial y a que las condiciones relativamente estables de humedad y temperatura permiten obtener resultados consistentes.

Publicaciones

Angulo Lewylle, M.; Maestro, M.; Comerio, R.; Lecuona, R. Aislamiento de hongos nematófagos para el control de parásitos intestinales de rumiantes. XIII Congreso Argentino de Micología, XXIII Jornadas Argentinas de Micología y 1.^a Reunión de la Asociación Micológica Carlos Spegazzini. Buenos Aires.

Maestro, M. 2016. Hongos nematófagos: una alternativa sostenible para el biocontrol de nematodos plaga. II Taller sobre Microorganismos destinados al Biocontrol de Plagas y Enfermedades. Rosario, Sanata Fe.

Maestro, M.; Lecuona, R. 2016. Evaluación de la capacidad predatoria de cinco aislamientos nativos del hongo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA PNAlyAV 1130034. Desarrollo de procesos para la transformación de biomasa en Bioenergía. 2013-2018.

Aislamiento y selección de cepas de *Escovopsis* sp. virulentas contra *Leucoagaricus gongylophorus* para el control de hormigas cortadoras
Isolation and selection of virulent strains of *Escovopsis* sp. against *Leucoagaricus gongylophorus* for the control of leafcutting ants

Julieta Beatriz Posadas¹ y Leonardo Udrea²

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Universidad de Buenos Aires (UBA). Facultad de Agronomía. *posadas.julieta@inta.gob.ar

Entre las I+D que se vienen realizando en la búsqueda de nuevas tecnologías para el control de hormigas, el control biológico juega un importante papel, en particular, el control microbiano mediante el uso de microorganismos benéficos que enferman y controlan a los artrópodos. En la presente línea de investigación, iniciada en 2017, se plantea un interesante enfoque que es destruir el propio alimento de las hormigas, el hongo Basidiomycete *Leucoagaricus gongylophorus* que cultivan en sus nidos. Este basidiomicete presenta un enemigo natural específico, un hongo del género *Escovopsis*. Este micoparásito se nutre de los tejidos del hongo cultivado reduciendo su biomasa y provocando cambios de comportamiento durante el forrajeo y una menor tasa reproductiva de la colonia, ocasionando la disminución del tamaño del hormiguero. Para utilizar efectivamente *Escovopsis* como un agente de biocontrol es necesario evaluar la actividad antagonista de diferentes aislamientos contra el cultivar fúngico, ya que el impacto negativo en la sobrevivencia de la colonia variará de acuerdo a las características propias de cada aislamiento de *Escovopsis* sp. El objetivo del presente trabajo fue aislar y posteriormente seleccionar cepas de *Escovopsis* sp. virulentas contra *L. gongylophorus* para ser incluidas en una estrategia de control microbiano de hormigas cortadoras.

Durante los meses de enero, febrero, marzo y abril de 2017 se colectaron “hongueras”. En una primera etapa, se monitorearon y marcaron 20 hormigueros de *Acromyrmex lundi* en el predio de INTA Castelar y posteriormente se colectaron las “hongueras” con hormigas y se llevaron a laboratorio, donde se dispusieron en pequeños hormigueros artificiales. Los hormigueros fueron alimentados y mantenidos en condiciones de laboratorio a fin de poder tomar muestras a diario. Se tomaron muestras de *L. gongylophorus* de los hormigueros estresados al momento de la colecta y luego una vez por semana. Bajo microscopio estereoscópico y cabina de flujo laminar se tomó una porción del hongo con un ansa y se colocó en placas de Petri con PDA más el agregado de cloranfenicol. Las placas se incubaron

en estufa a 25 °C durante 5 días. Los hongos crecidos se observaron bajo microscopio óptico y se compararon con claves. Se obtuvieron 9 aislamientos de *Escovopsis* sp. Estos fueron liofilizados y conservados en la micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos de IMYZA, INTA Castelar.

A partir de estos aislamientos, se comenzó a trabajar en la selección del aislamiento de *Escovopsis* sp. más virulento contra un aislamiento de *L. gongylophorus* obtenido de una colonia de *Acromyrmex lundii*. Se realizaron ensayos duales en placa de Petri. Se prepararon suspensiones de cada aislamiento fúngico y se ajustaron a 1×10^7 conidios/ml en cámara de Neubauer. En placas de Petri conteniendo agar papa glucosado (APG) se sembraron 0,02 ml con ansa calibrada. Primero en un lado de la placa se sembró *L. gongylophorus*, y tres días después *Escovopsis* sp. en el lado opuesto de la placa. Además, se realizaron controles donde se sembró cada hongo por separado en el centro de la placa. Para cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones. Se midió diariamente el crecimiento radial y se anotó la fecha de inicio de la esporulación. Además, se comparó el radio de *Escovopsis* sp. hacia ambos lados de la placa (RL y R, hacia el lado donde se sembró el basidiomycete y hacia el lado opuesto respectivamente) a fin de corroborar si el crecimiento es dirigido hacia *L. gongylophorus*. Tres de los 9 aislamientos evaluados presentaron una elevada virulencia. Se observó un crecimiento dirigido hacia el sitio de la placa donde se inoculó el basidiomycete (promedio R= 22 mm y RL= 60 mm) y además la esporulación en estos tres aislamientos fue mucho más rápida que en el testigo (promedio de 3 días para los cultivos duales y 7 días para el testigo). La mayor esporulación se presentó principalmente sobre *L. gongylophorus*. Con estos tres aislamientos se continuará trabajando. Se realizarán ensayos donde se evaluará en microcultivos la formación de ganchos y trampas a fin de poder correlacionar la presencia y abundancia de dichas estructuras con la virulencia del aislamiento, y de esta manera se seleccionarán los más virulentos para incluirlos en una estrategia de control microbiano de hormigas cortadoras.

Publicaciones

Udrea, L.; Posadas, J.B. 2018. Virulencia de cepas de *Escovopsis* sp. sobre un aislamiento de *Leucoagaricus gongylophorus* obtenido de hongueras de *Acromyrmex lundii*. IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental, 11-13 de abril de 2018. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Gomez, D.G.; Udrea, L.; Mini, J.I.; Posadas, J.B. 2018. Aislamiento de cepas de *Escovopsis* sp. a partir de hongueras de *Acromyrmex lundii* colectadas en el campo. X Congreso Argentino de Entomología, 21-24 de mayo de 2018. Mendoza, Argentina.

Control de hormigas cortadoras con hongos entomopatógenos y aceites esenciales de plantas aromáticas

Control of leaf-cutting ants using entomopathogenic fungi and essential oils of aromatic plants

Diego Gustavo Gómez¹, Julieta Beatriz Posadas^{1*}, Jorge Ignacio Mini¹, Valeria Rosselot² y Esteban Rubio³

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Recursos Biológicos (IRB). ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Área Metropolitana Buenos Aires (AMBA). *posadas.julieta@inta.gob.ar

Las hormigas cortadoras de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* son insectos sociales que se comportan como plagas herbívoras en agricultura y silvicultura. Han adquirido gran notoriedad por los daños que causan en diferentes países y tienen una gran incidencia en la pérdida de productividad de las plantaciones a nivel comercial, por ser insectos que se han adaptado a los ambientes modificados por el hombre. El control se realiza a través del tratamiento con compuestos químicos, los cuales además de generar resistencia en los insectos pueden tener efectos desfavorables sobre los microorganismos. Por tales motivos, resulta fundamental el empleo de técnicas menos contaminantes para su control, tal como el control microbiano con hongos entomopatógenos. El uso de insecticidas botánicos, tales como los aceites esenciales, también constituye una útil herramienta para el control de esta plaga. Con el objetivo final de implementar una estrategia de control de hormigas combinando el uso de hongos entomopatógenos con aceites esenciales que resulten atractantes, se aislaron y seleccionaron cepas de hongos entomopatógenos y se evaluó en el laboratorio el efecto de aceites esenciales de plantas aromáticas sobre colonias de hormigas cortadoras.

Desde el mes de enero hasta septiembre de 2017 se tomaron un total de 12 muestras de suelo de la zona del cultivo de frutillas de AMBA y 6 muestras en zonas próximas a este. Las muestras se llevaron al laboratorio para su procesamiento. Se diluyeron en agua destilada estéril y se agitaron en shaker por 2 horas. Luego se sembraron en diferentes medios de cultivo, los cuales se incubaron a 27 °C. Se logró obtener un aislamiento de *Beauveria bassiana* (Bb 381) y 2 de *Metarhizium anisopliae* (Ma 88 y Ma 89). Estos fueron liofilizados y conservados en la micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos de IMYZA, INTA Castelar. A partir de estos aislamientos y de dos cepas previamente seleccionadas en el LHE para el control de hormigas cortadoras (Bb 99 y Bb 361) se realizaron formulaciones granuladas con la adición de un atrayente a base de naranja y se realizaron las primeras

pruebas en hormigueros presentes en el AMBA. Se seleccionaron 18 hormigueros (3 por cada tratamiento), se marcaron y monitorearon. Posteriormente, por una parte, se colocaron 100 gramos de cada formulado en las bocas de los hormigueros y se monitoreó actividad durante 15 días. Para analizar los datos, se tomaron las mediciones de actividad de los hormigueros como datos cualitativos binomiales (activo/inactivo) y se calculó la proporción de hormigueros inactivos con respecto al total. Estos datos fueron analizados mediante un test de hipótesis para proporciones (Z). Cada tratamiento fue comparado con el testigo. La actividad disminuyó notablemente para los hormigueros tratados con las dos cepas seleccionadas anteriormente (Bb 99 y Bb 361), observándose una inactivación del 70 %. Los nuevos aislamientos no mostraron diferencias significativas con el testigo.

Por otra parte, y con el fin de evaluar el efecto de los aceites esenciales, provistos por el Instituto de Recursos Biológicos de INTA Castelar, de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y de menta inglesa (*Mentha piperita*) sobre 3 subcolonias de *Atta sexdens*, se llevó a cabo un bioensayo en laboratorio. El día previo al ensayo se separaron 3 “hongueras” de colonias distintas sin incluir a las reinas y a cada una se le conectó una arena de forrajeo. Se tiñeron granos de arroz con distintas coloraciones para poder diferenciar los tratamientos y fueron embebidos con 3 concentraciones de ambos aceites en hexano (20, 10, 5 % v/v). Se colocaron 9 granos de arroz por cada tratamiento más un control (arroz embebido solo en solvente) en la arena de forrajeo distribuidos al azar, en forma de grilla y se evaluó visualmente el efecto en el acarreo durante 2 horas. Se realizaron 3 réplicas para cada aceite. Al final del ensayo se contó el número de granos en la arena de forrajeo y se calculó el porcentaje de rechazo de acuerdo a la cantidad de arroz que no fue acarreado. Los datos se analizaron mediante un análisis de comparación de proporciones (Test Z). El aceite esencial de menta presentó mayor actividad repelente en todas las concentraciones evaluadas con respecto al de eucalipto, observándose que al 20 % v/v hubo un 100 % de rechazo. Para el eucalipto, este valor fue del 33,3 % a igual concentración. Se continuará evaluando aceites esenciales en el laboratorio, a fin de hallar alguno con actividad atrayente, que pueda ser empleado de manera combinada con hongos entomopatógenos en una estrategia integrada de control de hormigas cortadoras.

Publicaciones

Gómez, D.G.; Posadas, J.B.; Rosselot, V. 2018. Evaluación del efecto de los aceites esenciales de menta y eucalipto sobre colonias experimentales de hormigas cortadoras de la especie *Atta sexdens*. X Congreso Argentino de Entomología, 21-24 de mayo de 2018. Mendoza. Argentina.

Módulo: Control genético y comportamental

Mejoramiento del éxito de apareamiento luego del tratamiento con metopreno en machos de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): valor adaptativo y mecanismos de acción

Male sexual enhancement after methoprene treatment in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

Guillermo Enrique Bachmann^{1,2*}, Francisco Devescovi^{1,2}, Ana Laura Nussenbaum^{1,2}, Jorge Luis Cladera¹, Patricia Carina Fernández^{2,3}, María Teresa Vera^{2,4} y Diego Fernando Segura^{1,2}.

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Genética "E.A. Favret". ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Delta del Paraná. ⁴Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Facultad de Agronomía y Zootecnia. *guillebachmann@gmail.com

En el marco de la Actividad: 32035 "Estudio del efecto del metopreno sobre la tasa de liberación de feromona sexual en machos de *A. fraterculus* y la fecundidad de las hembras" del proyecto PNPV 1135033, se estudiaron los factores que afectan el comportamiento sexual de los machos de *Anastrepha fraterculus* y los mecanismos asociados utilizando un compuesto químico análogo de la hormona juvenil, el metopreno. Bajo el marco de la Técnica del Insecto Estéril se ha explorado el uso del metopreno para disminuir el tiempo necesario para alcanzar la madurez sexual del macho, reduciendo así los costos de mantenimiento de los individuos antes de ser liberados. Dado que el metopreno provoca aceleración de la maduración sexual en muchas especies de tefrítidos, en este trabajo se investigó si el tratamiento con metopreno provoca en los machos una mayor aceptación por parte de las hembras. Se analizó el perfil feromonal y el comportamiento de llamado sexual de los machos tratados con este compuesto. Por último, mediante la estimación de variables de fecundidad y fertilidad se evaluó el valor reproductivo asociado a este evento de selección sexual. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tratamiento con metopreno sobre el éxito de apareamiento de los machos dilucidando los mecanismos subyacentes y evaluar si la preferencia de las hembras por machos tratados con metopreno se debe a un beneficio directo relacionado con la fecundidad o fertilidad. Para determinar si el tratamiento con metopreno sobre los machos provoca mayor aceptación de los mismos por parte de las hembras se realizaron experimentos comportamentales en los que machos fueron ofrecidos individualmente junto a machos no tratados, a una hembra virgen, sexualmente madura.

El tratamiento con metopreno se realizó durante el primer día posemergencia de los adultos, mediante la aplicación (topicado) de 1 µl una solución de metopreno disuelto en

acetona con una concentración de 5 µg/µl sobre el tórax de cada macho. Luego se realizaron ensayos de apareamiento consistentes en arenas experimentales, cada una conteniendo un macho tratado, un macho control (no tratado) y una hembra. Se analizaron un total de 300 arenas experimentales. A su vez, para determinar si las hembras de *A. fraterculus* obtienen un beneficio directo cuando se aparean con machos tratados con metopreno, se comparó la fecundidad (número de huevos) y la fertilidad (porcentaje de eclosión de esos huevos) entre hembras apareadas con machos tratados y hembras apareadas con machos no tratados. Para ello se identificó a las hembras según el tipo de macho con el que se aparearon y se las colocó en frascos, en grupos de a 3 (respetando el tratamiento). A partir de ese momento (día 10-12 posemergencia), aproximadamente cada 2 días y durante 4 semanas, cada grupo de hembras fue provisto con una unidad de oviposición que simula una fruta en donde las hembras depositan sus huevos. Por un lado, tras 24 horas las unidades de oviposición se retiraron de los frascos y se recuperaron los huevos. Estos fueron incubados y tras 4 días se realizó el conteo de huevos (fecundidad) y el registro de eclosión (fertilidad). El tratamiento con metopreno sobre los machos incrementó su éxito de apareamiento. A su vez, los machos tratados con metopreno liberaron mayor cantidad de feromona sexual durante el cortejo. Por otro lado, no se evidenció un aumento en la tasa de llamado sexual. Por lo tanto, el mecanismo por el cual los machos tratados con metopreno alteran su fisiología provocando que sean preferidos por las hembras parece estar relacionado con un aumento en la producción de feromona y se encontraría desacoplado del mecanismo que desencadena el llamado sexual en esta especie. Con respecto al valor reproductivo asociado al evento de selección sexual, no se registró mayor fecundidad ni fertilidad para hembras apareadas con machos tratados con metopreno. Por lo tanto, la preferencia de las hembras por machos tratados no puede ser explicada en términos adaptativos sobre un aumento de fecundidad o fertilidad. Otras variables asociadas al fitness directo de las hembras, como la longevidad y el período refractario (tiempo que transcurre hasta una siguiente cópula) deberían ser consideradas en futuros estudios. Además, para las hembras podrían existir beneficios del tipo indirecto (rasgos de historia de vida de la descendencia) que no se consideraron en el presente estudio. Los resultados de este trabajo tienen importantes implicancias para el manejo de esta especie plaga a través del uso de la Técnica del Insecto Estéril, contribuyendo al mejoramiento del macho estéril y a la comprensión de este fenómeno biológico.

Publicaciones

Bachmann, G.E. 2016. Identificación de compuestos naturales que afectan el éxito copulatorio en machos de la mosca Sudamericana de la fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Bachmann, G.E.; Devescovi, F.; Nussenbaum, A.L.; Cladera, J.L.; Fernández, P.C.; Vera, M.T.; Teal, P.E.A.; Segura, D.F. 2017. Male sexual enhancement after methoprene treatment in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): a sustained response that does not fade away after sexual maturation. *Journal of Insect Physiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.06.009>

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

PICT 2013-0054. Estudio de interacciones entre moscas de los frutos (Tephritidae) y especies hospedadoras, parasíticas, competidoras y simbioses, como herramienta para desarrollar estrategias no contaminantes de control de esta plaga de la agricultura argentina. 2015-2017.

PIP 2014-2016. Interacciones entre moscas plaga de los frutos de la familia Tephritidae y sus especies hospedadoras, parasíticas, competidoras o simbioses: implicancias sobre el desarrollo de estrategias de control no contaminantes. 2015-2018.

Mejoramiento del éxito de apareamiento luego de la exposición a volátiles de guayaba en *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): valor adaptativo y mecanismos de acción

Male sexual enhancement after methoprene treatment *in Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

Guillermo Enrique Bachmann^{1,2*}, Silvina Anahí Belliard^{1,2}, Francisco Devescovi^{1,2}, María Laura Juárez^{2,3}, María Josefina Ruíz^{2,4}, María Teresa Vera^{2,3}, Jorge Luis Cladera¹, Patricia Carina Fernández^{2,5} y Diego Fernando Segura^{1,2}

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Genética "E.A. Favret". ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Facultad de Agronomía y Zootecnia. ⁴Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC). ⁵Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Delta del Paraná. *guillebachmann@gmail.com

En el marco de la actividad 32037 "Estudio de la respuesta de las hembras de *A. fraterculus* a mezclas artificiales de compuestos provenientes de guayaba", reformulada luego como la actividad 37827 del PNPV 1135033, se estudiaron los factores que afectan al comportamiento sexual de los machos de *Anastrepha fraterculus* y a los mecanismos asociados utilizando el fruto de la guayaba. La exposición a los olores que emite la guayaba provoca un mejoramiento del éxito de apareamiento de los machos (mayor aceptación por parte de las hembras). En este trabajo se investigaron los mecanismos asociados a este fenómeno, considerando la comunicación química, visual y acústica entre sexos. Por último, mediante la estimación de variables de fecundidad y fertilidad se evaluó el valor reproductivo asociado a este caso de selección sexual. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la exposición a volátiles de guayaba sobre el éxito de apareamiento de los machos dilucidando los mecanismos subyacentes y evaluar si la preferencia de las hembras por machos tratados con metopreno se debe a un beneficio directo relacionado con la fecundidad o fertilidad. Para determinar si la exposición a guayaba provoca mayor aceptación de los machos por parte de las hembras se realizaron experimentos comportamentales. La exposición a los volátiles de guayaba se realizó entre los días 2 y 6 posemergencia de los adultos. Luego se realizaron ensayos de apareamiento en arenas experimentales, cada una conteniendo un macho expuesto, un macho control (no expuesto) y una hembra. Se analizaron un total de 300 arenas experimentales. A su vez, se comparó la fecundidad y la fertilidad entre hembras apareadas con machos expuestos y hembras apareadas con machos no expuestos. Para ello se identificó a las hembras según el tipo de macho con el que se aparearon y se las colocó en frascos, en

grupos de a 3 (respetando el tratamiento). A partir de ese momento (día 10-12 postemergencia), aproximadamente cada 2 días y durante 4 semanas, cada grupo de hembras fue provisto con una unidad de oviposición que simula una fruta en donde las hembras depositan sus huevos. Tras 24 horas las unidades de oviposición se retiraron de los frascos y se recuperaron los huevos. Estos fueron incubados y después de 4 días se realizó el conteo de huevos (fecundidad) y el registro de eclosión (fertilidad). La exposición a volátiles sobre los machos incrementó su éxito de apareamiento. Los machos expuestos a la guayaba liberaron mayor cantidad de feromona y realizaron el comportamiento de llamado sexual más frecuentemente. Por lo tanto, la preferencia de las hembras por machos expuestos a guayaba puede ser explicado mediante una mayor actividad de cortejo por parte del macho. A su vez, las hembras apareadas con los machos expuestos a guayaba presentaron mayor fecundidad con respecto a las hembras apareadas con machos no expuestos. Por lo tanto, la preferencia de las hembras por machos expuestos puede explicarse en términos adaptativos basados en un aumento de fecundidad. Los machos durante la cópula, además de esperma, pueden transferir a las hembras compuestos bioactivos como hormona juvenil que estimulan la maduración de oocitos. Por un lado, si la presencia de guayaba disparó en los machos un aumento de la actividad sexual mediado por un incremento de la producción de hormona juvenil, entonces este compuesto también podría haberse transferido a las hembras en mayores cantidades que para machos no expuestos. Por otro lado, otras variables asociadas al *fitness* directo de las hembras, como la longevidad y el período refractario (tiempo que transcurre hasta una siguiente cópula) deberían ser consideradas en futuros estudios. Además, para las hembras podrían existir beneficios del tipo indirecto (rasgos de historia de vida de la descendencia) que no se consideraron en el presente estudio. Los resultados de este trabajo tienen importantes implicancias para el manejo de esta especie plaga a través del uso de la Técnica del Insecto Estéril, contribuyendo al mejoramiento del macho estéril y a la comprensión de este fenómeno biológico.

Publicaciones

- Bachmann, G. 2016. Identificación de compuestos naturales que afectan el éxito copulatorio en machos de la mosca Sudamericana de la fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- Bachmann, G.; Segura, D.; Devescovi, F.; Juárez, M.; Ruiz, M.; Vera, M.; Cladera, J.; Teal, P.; Fernández, P. 2015. Male sexual behaviour and pheromone emission is enhanced by exposure to guava fruit volatiles in *Anastrepha fraterculus*. PLOS ONE. doi: 10.1371/journal.pone.0124250.

- Bachmann, G.; Vera, M.; Teal, P.; Ruiz, M.; Juárez, M.; Cladera, J.; Segura, D.; Fernández, P. 2014. Role of guava volatiles on *Anastrepha fraterculus* male sexual display and pheromone release. 9th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance (ISFFEI), 12-16 de junio de 2014. Bangkok, Tailandia.
- Segura, D.F.; Bachmann, G.E.; Kalinová, B.; Břízová, R.; Hoskovec, M.; Vera, M.; Fernández, P. 2015. Respuesta electrofisiológica en antenas de hembras de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) frente a compuestos feromonales y extractos cuticulares de machos expuestos a guayaba. IX Congreso Argentino de Entomología, 19-22 de mayo de 2015. Posadas, Misiones, Argentina.
- Bachmann, G.E.; Kalinova, B.; Brizova, R.; Hoskovec, M.; Fernández, P.C.; Vera, M.T.; Segura, D.F. 2016. Guava volatiles enhance the sexual behavior of Sudamerican fruit fly (Diptera: Tephritidae) males with no evident changes in their pheromone and cuticle chemical profiles. 32nd Annual meeting of International Society of Chemical Ecology. Foz de Iguazú, Brasil. .
- Belliard, S.A.; Bachmann, G.E.; Ruíz, J.; Valladares, G.; Vera, M.T.; Fernández, P.C.; Cladera, J.L.; Segura, D.F. 2018. Efecto de la exposición a extractos de guayaba sobre el éxito copulatorio en *Anastrepha fraterculus*. X Congreso Argentino de Entomología. 21-24 de mayo de 2018. Mendoza, Argentina.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

- PICT 2013-0054. Estudio de interacciones entre moscas de los frutos (Tephritidae) y especies hospedadoras, parasíticas, competidoras y simbiotes, como herramienta para desarrollar estrategias no contaminantes de control de esta plaga de la agricultura argentina. 2015-2017.
- PIP 2014-2016. Interacciones entre moscas plaga de los frutos de la familia Tephritidae y sus especies hospedadoras, parasíticas, competidoras o simbiotes: implicancias sobre el desarrollo de estrategias de control no contaminantes. 2015-2018.

Estudio del efecto de bacterias del tracto digestivo sobre el éxito copulatorio del macho de *Anastrepha fraterculus*

Effect of gut bacteria on the mating success of *Anastrepha fraterculus* males

Julieta Salgueiro¹, Silvia Beatriz Lanzavecchia¹, Guillermo Enrique Bachmann^{1,2}, Fabián Horacio Milla¹, María Teresa Vera³, Patricia Fernández^{2,4} y Diego Fernando Segura^{1,2*}.

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Genética "E. A. Favret". ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Facultad de Agronomía y Zootecnia. ⁴Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Delta del Paraná. *segura.diego@inta.gov.ar

Como parte de una caracterización funcional de las bacterias intestinales de *Anastrepha fraterculus*, en esta actividad se procedió a estudiar la diversidad de bacterias en muestras silvestres y muestras de laboratorio, así como a obtener aislamientos de ambos orígenes que pudieran ser utilizados en bioensayos que arrojaran información sobre el rol que bacterias específicas tienen sobre la biología de la plaga. Sobre la hipótesis que la comunidad microbiana intestinal de moscas silvestres se modifica durante la adaptación al laboratorio o domesticación, planteamos los siguientes objetivos: 1) comparar la diversidad bacteriana intestinal entre moscas de laboratorio y silvestres; 2) comparar dicha comunidad entre insectos en proceso de domesticación e insectos de laboratorio; 3) estudiar si el efecto de la domesticación depende del sexo y de los días y de la alimentación del hospedador. Se colectaron insectos de la cría de laboratorio (Lab) y silvestres (Wild) de ubajay (*Hexachlamys edulis*) y feijoa (*Feijoa sellowiana*), denominados WU y F0. Por una parte, con F0 se estableció una cría de laboratorio durante 6 generaciones (F1-F6). Al día 1 de emergencia se diseccionaron 15 machos y 15 hembras (sin alimentar) de cada origen Lab y F0, F1, F3, F6 conformando 3 réplicas de 5 intestinos cada una. El procedimiento se repitió con adultos de 30 días (alimentados). Por otra parte, los adultos WU fueron capturados en trampas y luego diseccionados de la misma forma. La identificación genética de las bacterias intestinales se realizó por secuenciación masiva de amplicones de la región V3-V4 del gen ribosomal 16S (Illumina MiSeq). Se encontró que los perfiles microbiológicos provenientes de insectos Wild y Lab difieren significativamente. Los primeros presentan grupos de Proteobacterias no detectadas en Lab. A partir del análisis de las comunidades en distintas generaciones (F1-F6), se detectó que la F6 es la única cuya comunidad bacteriana intestinal no difiere significativamente de insectos Lab. F1 y F3 muestran mayor diversidad alfa y difieren estadísticamente de insectos Lab. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas entre las comunidades bacterianas intestinales de machos y hembras. Se destaca la

dominancia del género *Wolbachia* en moscas de 1 día (sin alimentar) y *Enterobacter* a los 15 y 30 días (alimentados) independientemente del tratamiento. La domesticación de *A. fraterculus* afecta su diversidad bacteriana intestinal y el perfil resultante depende de los días y alimentación del hospedador. A partir de las diferencias encontradas entre los perfiles microbianos de moscas Lab, Wild y en proceso de adaptación al laboratorio se planteó como objetivo conformar un cepario con aislamientos obtenidos de dichos orígenes. Se colectaron machos adultos de *A. fraterculus* de 3 orígenes diferentes; laboratorio (LL), captura silvestre (WW) y adultos derivados de fruta de guayaba infestada (WL), es decir que emergieron de guayaba, pero recibieron dieta de laboratorio en su estado adulto. Se realizaron las disecciones conformando *pooles* de 5 intestinos, 3 réplicas por origen. Los aislamientos bacterianos se seleccionaron según las características morfológicas de sus colonias y se identificaron mediante Colony-PCR y la secuenciación del gen 16S rRNA. Dos aislamientos llamados WW1.13 y LL1.14, identificados como *Enterobacter*, se probaron como probióticos. Las bacterias se cultivaron en LB (cultivos W y L, respectivamente) y la mitad del volumen de cada cultivo se sometió a autoclave (cultivos Wa y La, respectivamente). Los huevos de *A. fraterculus* se transfirieron a medio larval artificial sometidos a diferentes tratamientos de LB-probiótico añadiendo: L, La, W, Wa, y medio LB (medio sin bacterias) y un control negativo utilizando dieta de las larvas sin medio LB (D). Variables registradas: % de eclosión de huevos, % de pupación en el día 10 después de la siembra, % de recuperación de pupas de huevos, peso de pupa. Obtuvimos un total de 168 aislamientos bacterianos de intestinos de LL, WW y WL. Los géneros más representativos fueron identificados como *Enterococcus* sp., *Providencia* sp. y *Enterobacter* sp. obtenidos de WL; *Kluyvera* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. de LL; y *Serratia* sp., *Enterococcus* sp., *Citrobacter* sp., *Erwinia*, *Pantoea* sp., *Kluyvera* sp., *Enterobacter* sp en WW. Con base en los grupos taxonómicos identificados, observamos la mayor riqueza de bacterias intestinales cultivables en WW y la más baja en LL. El resultado del ensayo probiótico mostró una falta de diferencias significativas entre los orígenes para todas las variables registradas. No obstante, el porcentaje de recuperación de pupas de huevo mostró una tendencia a valores más altos en La y W en comparación con los otros tratamientos, y al mismo tiempo exhibió un bajo % de pupación al décimo día. Aunque no se detectaron efectos significativos, se estableció un bioensayo probiótico consolidado.

Publicaciones

- Salgueiro, J.; Nussenbaum, A.; Juárez, M.; Vera, M.; Bourtzis, K.; Cladera, J.; Lanzavecchia, S.; Segura, D. 2018. Cultivable gut bacteria from *Anastrepha fraterculus*. 10th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. Tapachula, Chiapas, México.
- Salgueiro, J.; Pimper, L.; Segura, D.; Cladera, J.; Tsiamis, G.; Lanzavecchia, S. 2018. Impact of domestication of wild *Anastrepha fraterculus* on the gut bacterial community. 10th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. Tapachula, Chiapas, México.
- Segura, D.; Salgueiro, J.; Pimper, L.; Tsiamis, G.; Cladera, J.L.; Lanzavecchia, S. 2018. Domesticando moscas y bacterias. Congreso Argentino de Entomología. Mendoza, Argentina.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

- Proyecto INTA-IAEA N° 17041. Bacteria associated to *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): characterization and effect on sterile males sexual competitiveness. 2012-2017.
- PICT 2013-0054. Estudio de interacciones entre moscas de los frutos (Tephritidae) y especies hospedadoras, parasíticas, competidoras y simbiotes, como herramienta para desarrollar estrategias no contaminantes de control de esta plaga de la agricultura argentina. 2015-2017.
- PIP 2014-2016. Interacciones entre moscas plaga de los frutos de la familia Tephritidae y sus especies hospedadoras, parasíticas, competidoras o simbiotes: implicancias sobre el desarrollo de estrategias de control no contaminantes. 2015-2018.

Estudio genético y funcional de las bacterias intestinales de larvas de *Anastrepha fraterculus*

Gut bacteria associated to *Anastrepha fraterculus* larvae: genetic and functional characterization

Julieta Salgueiro^{1*}, Silvia Beatriz Lanzavecchia^{1,2}, Ana Laura Nussenbaum^{1,2} y Diego Fernando Segura^{1,2}

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Genética "E.A. Favret". ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). *salgueirojuliet@gmail.com

En el marco de la actividad 37691, del proyecto PNPV 1135033, se inició la caracterización de la microbiota intestinal asociada a las larvas de *Anastrepha fraterculus*. Con este objetivo, se seleccionaron 2 regiones, Concordia (ubicada al noreste) y Horco Molle (ubicada al noroeste) junto con 2 especies frutales, durazno (*Prunus persica*) y guayaba (*Psidium guajava*). En cada región, se muestrearon al azar 6 árboles de cada especie frutal; y dentro de cada árbol se colectaron 5 frutas. De esta manera, la muestra contó con un total de 120 muestras (2 regiones x 2 hospederos x 6 árboles x 5 frutas). Al concretar el muestreo se tomó 1 fruta extra por árbol, exceptuando 3 árboles (DC4, DT4, GC3) en los que solo tomamos 5 frutas debido a la baja cantidad de larvas encontradas. Dichas muestras extra sumaron 20 frutos más a los mencionados 120, cerrando en un total de 140 muestras. La fruta fue luego transportada al IGEAF, CICVyA (INTA), donde fue disecada en su totalidad. Para cada muestra se registró el número de larvas de *A. fraterculus* y *Ceratitidis capitata*, las cuales fueron identificadas sobre la base de sus espiráculos posteriores. En todos los casos, se midió y registró el peso y pH de cada fruto. Tomando 5 larvas de *A. fraterculus* por fruto, se procedió a la disección y extracción de los intestinos larvales en condiciones de esterilidad conformando 140 muestras, cada una de 5 intestinos larvales. Sobre cada muestra, se procedió a la extracción de ADN siguiendo métodos estándar (Baruffi con modificaciones). Tras corroborar que la cantidad de ADN extraído superara los niveles mínimos requeridos, las muestras se enviaron a la Universidad de Patras, donde en colaboración con el Dr. George Tsiamis, se procedió a la amplificación de las regiones variables V3 y V4 del gen 16S rRNA mediante PCR usando los primers Miseq 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) y 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC). Posteriormente se realizó el Indexado y una vez conformada la *library* se envió a secuenciar por Illumina MiSeq.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA-IAEA N° 17041. Bacteria associated to *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): characterization and effect on sterile males sexual competitiveness. 2012-2017.

Estudios de las señales químicas en el sitio de oviposición en el picudo del algodnero: su efecto disuasorio de nuevas infestaciones

Chemical signals associated to the oviposition site in the cotton boll weevil: deterrent effect to re-infestation

Ana Laura Nussenbaum^{1,2*}, Guillermo Enrique Bachmann^{1,2}, Patricia Fernández^{2,3}, María Teresa Vera^{2,4} y Diego Fernando Segura^{1,2}

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Genética "E. A. Favret". ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Delta del Paraná. ⁴Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Facultad de Agronomía y Zootecnia. *ananussen@gmail.com

El picudo del algodnero, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), es considerado una de las plagas más importantes del algodón en América. Los daños son ocasionados por los adultos al alimentarse y oviponer dentro de los órganos reproductivos de la planta produciendo un alto porcentaje de abscisión de estos y grandes pérdidas al momento de la cosecha. En Argentina, el picudo fue hallado por primera vez en 1993 con una rápida dispersión en las provincias de mayor producción algodnora, perjudicando principalmente a pequeños y medianos agricultores. Estudios previos mostraron que las hembras de este insecto oviponen preferencialmente en pimpollos no infestados, lo que sugiere la posibilidad de que las hembras reconozcan la infestación previa. El objetivo principal de esta actividad es estudiar compuestos químicos liberados por el picudo del algodnero que afectan su comportamiento (semioquímicos), y pueden ser utilizados en el manejo de esta plaga. En particular, se busca obtener compuestos que reduzcan el daño ocasionado en los pimpollos de algodón mediante el uso de la feromona depositada por las hembras de *A. grandis* durante la oviposición, ODP (del inglés *oviposition deterrent pheromone*). Recientemente, se avanzó en el estudio del comportamiento de rechazo de pimpollos previamente infestados por parte de las hembras de *A. grandis* siguiendo dos posibles aproximaciones. Una aproximación directa donde se estudió la preferencia de las hembras de *A. grandis* hacia pimpollos sanos e infestados en laboratorio, y una indirecta donde fueron estudiadas las distribuciones de oviposiciones en muestras de pimpollos obtenidas en campo. Además, fueron evaluados los costos, en término del *fitness* de la descendencia, asociados con múltiples oviposiciones en los pimpollos. Los resultados obtenidos sugieren que las hembras son capaces de reconocer pimpollos previamente infestados, rechazando esta condición para su oviposición en el laboratorio. En los estudios de campo, se encontró que las distribuciones de las oviposiciones en los pimpollos obtenidos del suelo mostraron un patrón uniforme, lo que sugiere que en el

campo se respeta este comportamiento de evitación de pimpollos con infestación previa. Respecto a los costos asociados a oviponer en pimpollos previamente infestados, se encontró que existe una disminución significativa del peso a mayor número de oviposiciones en un mismo pimpollo. También se observó una tendencia a producir hembras a medida que el número de oviposiciones, y por lo tanto la competencia, aumenta. Por último, fue estudiado el momento en que se produce la eliminación de las larvas y se observó que en la mayoría de los pimpollos se encontraba una sola larva del último estadio larval (larva 3), indicando que la eliminación ocurre entre larva 1 y larva 2, antes de mudar al último estadio larval. Las conclusiones obtenidas hasta el momento apoyan la existencia de una ODP, que probablemente es reconocida por receptores gustativos (de contacto) o a corta distancia por receptores olfativos, y permite a las hembras reconocer pimpollos con oviposiciones previas y rechazar ese pimpollo como sitio de oviposición. Este comportamiento disuasivo resultaría en un efecto positivo en el *fitness* de la hembra.

Publicaciones

Nussenbaum, A.L.; Devescovi, F.; Fogar, M.N.; Salerno, J.C.; Cladera, J.L.; Lecuona, R.E.; Segura, D.F. 2018. Discrimination of infested cotton squares by females of *Anthonomus grandis*. *Journal of Pest Science* 91 (1): 107–119.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto IAEA-INTA 19265. Fruit preference and acceptance by *Anastrepha fraterculus*: baseline information to improve the implementation of SIT to control this pest. 2015-2019.

Bases genéticas y moleculares de la determinación del sexo en *Anastrepha fraterculus* en apoyo al desarrollo e implementación de la Técnica del Insecto Estéril

Genetic and molecular bases of sex determination of *Anastrepha fraterculus* in support of the development and implementation of the Sterile Insect Technique

María Cecilia Giardini^{1*}, Fabián Horacio Milla¹, Jorge Luis Cladera¹ y Silvia Beatriz Lanzavecchia¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Genética "E. A. Favret".
*giardini.maria@inta.gob.ar

La mosca sudamericana de la fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae), es una plaga de frutales de importancia económica en nuestro país. Se distribuye en zonas de clima subtropical a templado afectando la producción frutihortícola de la región del NEA, NOA y Cuyo, y región Pampeana. Actualmente solo se utilizan productos químicos para su control. La presente línea de trabajo tuvo como objetivo general contribuir con el desarrollo de estrategias no contaminantes para controlar esta plaga mediante herramientas citogenéticas y moleculares. Nos propusimos realizar una caracterización profunda de los cromosomas de esta especie con énfasis en los cromosomas sexuales, incluyendo regiones genómicas presentes solo en machos y asociadas a los factores determinantes de la masculinidad. También planeamos identificar características diagnósticas que distingan líneas de laboratorio de individuos silvestres. Primeramente, realizamos un *screening* citogenético con el fin de determinar la presencia de variabilidad en los cromosomas sexuales en muestras de la cría experimental de *A. fraterculus* mantenida en nuestro laboratorio y poblaciones silvestres (Tucumán, Entre Ríos, Misiones, La Rioja, Buenos Aires). Se analizaron preparados de cromosomas mitóticos obtenidos de ganglio cerebral de larvas en estadio 3, se tiñeron con DAPI y se observaron al microscopio (1000x). Luego del análisis de 100 preparados de individuos de laboratorio y 20 muestras de cada población silvestre pudimos determinar la existencia de dos variantes de cromosomas X (X_1 y X_2) y dos variantes de cromosomas Y (Y_5 e Y_6). El cromosoma X_1 es submetacéntrico grande, con una banda DAPI+/CMA- en los extremos de ambos brazos. La variante X_2 es aproximadamente un 25 % mayor que la variante 1, debido a la presencia de un satélite en el extremo del brazo corto; este satélite presenta una tinción positiva con DAPI y negativa con cromomicina A_3 . Además, esta variante, retiene la banda positiva de DAPI en el extremo proximal del cromosoma, sin observarse la del extremo distal. El cromosoma Y_5 es metacéntrico y es el cromosoma de menor tamaño

descripto hasta el momento, con bandas DAPI+/CMA+ en cada uno de sus extremos. Por último, la variante Y_6 es submetacéntrica, de mayor tamaño, y presenta una banda DAPI+/CMA- en el extremo proximal. La configuración de cromosomas sexuales más comúnmente encontrada en las poblaciones argentinas es X_1Y_5 (95 % en poblaciones silvestres; 75 % en la cepa de laboratorio); no se detectaron combinaciones X_2X_2 ni X_2Y_6 . En función de estos resultados se decidió obtener líneas de *A. fraterculus* portadoras de la configuración observada en alta frecuencia X_1Y_5 para estudios posteriores, relacionados con regiones genómicas asociadas al cromosoma Y, y otras portadoras de las variantes poco frecuentes X_2 e Y_6 para estudiar su viabilidad y parámetros biológicos. A partir de la línea X_1Y_5 se realizaron extracciones de ADN total de machos y hembras (pooles de 5 individuos) y se analizaron los patrones de bandas mediante la técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) en busca de bandas exclusivas de machos. Para ello se utilizaron 2 combinaciones de enzimas, *EcoRI-MseI* y *PstI-MseI* y 10 combinaciones de oligonucleótidos. Se identificaron un promedio de 18 fragmentos amplificados/combinación de tamaños desde 100 a 400 pb. Se obtuvo un total de 181 bandas nítidas, claras y reproducibles con un 77 % correspondiente a fragmentos polimórficos, sin embargo, ningún polimorfismo estuvo relacionado con el sexo. Estos resultados evidencian la dificultad que presentan las regiones específicas del cromosoma Y para poder ser amplificadas mediante este tipo de tecnologías posiblemente por la amplitud de las regiones y por su naturaleza altamente heterocromatínica. Alternativamente al método molecular se pusieron a punto las técnicas de GISH (Genomic *in situ* Hybridization) y de CGH (Comparative Genomic Hybridization) para analizar la naturaleza de las diferencias existentes en los cromosomas sexuales de *A. fraterculus*. Estas técnicas de hibridación *in situ* permitieron obtener las primeras evidencias de localización de regiones compartidas entre los cromosomas X e Y como así también delimitar regiones exclusivas del cromosoma Y. Estos estudios se realizaron utilizando preparados de individuos portadores de las configuraciones más frecuentes (X_1Y_5/X_1X_1), posteriormente la misma técnica se utilizará en individuos portadores de las configuraciones X_1Y_6 y X_1X_2 para continuar profundizando los conocimientos y realizar hipótesis sobre el origen y la evolución de los cromosomas sexuales de la especie. En forma paralela a estas técnicas actualmente se está trabajando en la puesta a punto la técnica de microdissección para obtener secuencias específicas del cromosoma Y. Esta técnica involucra la disección de cromosomas Y completos a partir de preparados de cromosomas mitóticos y luego su amplificación mediante DOP PCR. Este material será posteriormente usado para técnicas citogenéticas de hibridación *in situ* como así también para ser secuenciado. Para continuar con esta actividad se presentó un proyecto de intercambio binacional (Alemania-Argentina) y una beca con un

grupo referente en citogenética molecular. Las actividades desarrolladas forman parte de una tesis doctoral y constituyen una línea de investigación de importancia para el grupo de trabajo. Consideramos que los resultados obtenidos hasta el momento representan aportes valiosos sobre aspectos genéticos y citogenéticos de esta plaga de importancia económica para nuestro país y generan herramientas potencialmente útiles para el desarrollo de cepas de laboratorio de referencia para la implementación de la Técnica del Insecto Estéril (TIE) en apoyo a medidas desarrolladas por el PROCEM (Programa Nacional de Control y Erradicación de moscas de la fruta) SENASA en las regiones del territorio más afectas por esta especie plaga.

Publicaciones:

- Cladera, J.L.; Vilardi, J.; Juri, M.; Paulin, L.; Giardini, M.; Gómez Cendra, P.; Segura, D.; Lanzavecchia, S.B. 2014. Genetics and biology of *Anastrepha fraterculus*: research supporting the use of the sterile insect technique (SIT) to control this pest in Argentina. *BMC Genetics* 15 (Suppl 2):S12.
- Giardini, M.C.; Milla, F.H.; Lanzavecchia, S.; Nieves, M.; Cladera, J.L. 2015. Sex chromosomes in mitotic and polytene tissues of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) from Argentina: a review. *Zookeys* 540: 83-94.
- Giardini, M.; Gariou-Papalexiou, A.; Augustinos, A.; Drosopoulou, E.; Lanzavecchia, S.; Cladera, J.; Caceres, C.; Bourtzis, K.; Mavragani-Tsipidou, P.; Zacharopoulou, A. 2016. Cytogenetic Analysis of the South American Fruit Fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) Species Complex: Construction of Detailed Photographic Polytene Chromosome Maps of the Argentinian Af. sp.1 Member. *PlosONE* 11(6): e0157192. doi:10.1371
- Giardini, M.C.; Milla, F.H.; Nieves, M.; Cladera, J.L.; Lanzavecchia, S.B. 2016. Cytogenetic characterization of sexual chromosomes in the Y-short *Anastrepha fraterculus* strain. 21st ICC (International Chromosome Conference), 10-13 de julio de 2016. Foz de Iguazú, Brasil.
- Giardini, C. 2016. *Anastrepha fraterculus* cytogenetics. (Comunicación Oral). 9TWWH 9.^a Reunión del Grupo de Trabajo en Moscas de la Fruta del Hemisferio Occidental, 16-21 de octubre de 2016. Buenos Aires, Argentina.
- Giardini, C.; Gariou-Papalexiou, A.; Augustinos, A.; Drosopoulou, E.; Lanzavecchia, S.; Cladera, J.; Caceres, C.; Bourtzis, K.; Mavragani-Tsipidou, P.; Zacharopoulou, A. 2016. Contribution of cytogenetics to phylogenetic relationships inference among closely related taxa: the cytogenetic analysis of the Argentinian Af. sp.1 member of the

Anastrepha fraterculus complex. 9TWWH. 9ª Reunión del Grupo de Trabajo en Moscas de la Fruta del Hemisferio Occidental, 16-21 de octubre de 2016. Buenos Aires, Argentina.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA-IAEA N° 18822. Evaluation of genetic and biotechnological tools for the development of an *Anastrepha fraterculus* sexing strain in Argentina. 2015-2020.

PICT 2012-0704. Desarrollo y aplicación de marcadores moleculares hiper- variables en apoyo a la implementación de la TIE para la mosca sudamericana de la fruta, *Anastrepha fraterculus*, en Argentina. 2014-2016.

Efecto de rayos X sobre el cariotipo y el esperma de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

The effect of X-rays on the karyotype and sperm of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Leonela Carabajal Paladino¹, Cynthia Lorena Cagnotti² y Silvia Noemí López^{2*}

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Genética. ²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. (IMyZA).

*lopez.silvia@inta.gob.ar

La polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917) (Lepidoptera:Gelechiidae), es una plaga originaria de Sudamérica. Se encuentra distribuida en la mayor parte de las zonas productoras de tomate (*Solanum lycopersicum* Linnaeus) del mundo causando importantes daños. Dentro de los métodos utilizados para el control de plagas, se encuentra la técnica del insecto estéril que utiliza radiaciones ionizantes. Una variación de esta es la esterilidad heredada (EH). Con el objeto de desarrollar esta técnica es indispensable entender su genética y su biología.

En esta actividad se analizó el cariotipo y el tipo de cambios cromosómicos provocados por la irradiación de los individuos en el estado de pupa. Asimismo, y dado que los machos de lepidópteros producen dos tipos diferentes de esperma (paraespermatozoides apirenos y euespermatozoides) se analizó la morfología espermática y la proporción de esperma en individuos salvajes e irradiados con rayos X. Finalmente se estudió la morfología del esperma eupireno en la *bursa copulatrix* de hembras apareadas con machos irradiados y no irradiados. El número cromosómico diploide de *T. absoluta* es $2n = 58$, incluyendo el par de cromosomas sexuales: ZZ en machos y WZ en hembras, que constituyen los elementos de mayor tamaño en el complemento. La irradiación de pupas en un irradiador de rayos X con una dosis de 200 Gy generó diferentes reordenamientos cromosómicos incluyendo translocaciones y fragmentaciones, resultando en alteraciones en el número cromosómico. El análisis de los paquetes de espermatozoides de *T. absoluta* reveló un marcado polimorfismo entre los paquetes de esperma apireno y eupireno. La irradiación de los individuos con dosis de 100, 150, 200 y 250 Gy no tuvo un efecto significativo sobre la proporción de esperma apireno:eupireno. Sin embargo, los machos irradiados con 300 Gy produjeron una cantidad significativamente mayor de espermatozoides apirenos que los no irradiados. Todas las dosis de radiación provocaron deformaciones en la morfología de los paquetes de esperma eupireno. Estos paquetes deformes podrían ser utilizados como bioindicadores durante el

proceso de monitoreo llevado a cabo en los programas de EH luego de la liberación de machos irradiados. Los espermatozoides eupirenos deformes fueron transferidos a las *bursae copulatricis* de las hembras durante la cópula. Los machos tratados con 200 Gy transfirieron a las hembras con las que copularon una cantidad mayor de espermatozoides deformes que los individuos no irradiados. Estos resultados explicarían la disminución de la fertilidad observada en estudios previos en hembras de la polilla cruzadas con machos irradiados con 200 Gy.

Los resultados aquí presentados proveen información esencial sobre la citología de *T. absoluta*, la cual es necesaria para evaluar la calidad de los insectos liberados y para un mejor entendimiento y aplicación de EH contra esta especie de importancia económica mundial.

Publicaciones

Carabajal Paladino, L.Z.; Ferrari, M.E.; Lauría, J.P.; Cagnotti, C.L.; López, S.N. 2016. Impact of X-rays on cytological traits of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Florida Entomologist. 99: 43-53.

Lauría, J.P.; Carabajal Paladino, L.Z.; Cagnotti, C.; Cladera, J.L.; López, S.N. 2013. Análisis del esperma eupireno transferido por *Tuta absoluta* (Lepidoptera) durante la cópula. XLII Congreso Argentino de Genética, III Reunión Regional SAG-NOA, 20-23 de octubre de 2013. Salta, Argentina.

Cagnotti, C.L.; Carabajal, L.Z.; López, S.N. 2014. Development of the sterile insect technique to control the tomato moth *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Final Research Coordination Meeting on Increasing the Efficiency of Lepidoptera SIT by Enhanced Quality Control. IAEA (International Atomic Energy Agency). 02-07 de junio de 2016. Kelowna, Canadá.

Proyectos con los que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA-IAEA N° 16332. Development of the Sterile Insect Technique to control the tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) (financiado por la Agencia Internacional de Energía Atómica). 2010-2014.

Efecto de la radiación gamma sobre parámetros biológicos de la polilla del tomate *Tuta absoluta*

Effect of gamma radiation on biological parameters of the tomato moth *Tuta absoluta*

María Verónica Yusef^{1*}, Silvia Noemi López², Severino Carlos Michelin³, Herlinda Luciana Britos¹ y Antonio Solis¹

¹Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Laboratorio de Control de plagas. ²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA).

³Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN). Laboratorio de Radiopatología. *mvyusef@gmail.com

La polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), es una plaga originaria de Sudamérica. Se encuentra distribuida en la mayor parte de las zonas productoras de tomate (*Solanum lycopersicum* Linnaeus) del mundo causando importantes daños. Dentro de los métodos utilizados para el control de plagas, se encuentra la técnica del insecto estéril que utiliza radiaciones ionizantes. Una variación de esta es la esterilidad heredada. Los machos de lepidópteros producen dos tipos diferentes de esperma, paraespermatozoides apirenos y euespermatozoides. El objetivo del trabajo fue primeramente establecer la cría de *T. absoluta* para realizar los bioensayos. Posteriormente establecer el tipo y frecuencia de las alteraciones morfológicas del esperma de machos irradiados con rayos gamma en estado de pupa y de su descendencia F1 y finalmente poner a punto el acondicionamiento del material para su irradiación como adulto.

Se comenzó la cría de *T. absoluta* con ejemplares provenientes del Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica del INTA Castelar en las instalaciones de la CNEA con el fin de obtener pupas para realizar los diferentes bioensayos. Se analizaron el tipo y frecuencia de alteraciones morfológicas en los paquetes de esperma eupireno en individuos machos de la generación Fo, irradiados en el estado de pupa madura con 130 Gy (dosis que induce esterilidad heredada determinada en trabajos anteriores) y en no irradiados, como controles. Luego de la irradiación de las pupas y una vez emergidos los adultos, bajo estereomicroscopio se realizó la extracción y disgregación de los testículos. Se analizó la morfología de los paquetes de esperma eupireno. Como control positivo de alteraciones morfológicas se utilizaron pupas irradiadas con 180 Gy. También se determinó el tipo y frecuencia de las alteraciones morfológicas inducidas en los euespermatozoides individuales en machos de la generación Fo, irradiados con 130 Gy en estado de pupa. Se utilizaron pupas irradiadas con 180 Gy como control positivo de alteración y no irradiados como controles. Una vez emergidos los adultos se realizó la extracción y disgregación de los testículos y de los

paquetes. El preparado se tiñó con el colorante fluorescente DAPI y se observó la morfología del esperma con microscopio de epifluorescencia. Se realizaron los estudios de transferencia de esperma de individuos machos irradiados. Para ello se irradiaron pupas masculinas con dosis de 0, 130 y 180 Gy y se cruzaron con hembras sin irradiar. Las parejas copulando fueron interrumpidas a 1,5 horas y se colocaron, aún unidas, en microtubos tipo Eppendorf de 1,5 ml en freezer a -20 °C para su preservación. Posteriormente se realizaron ensayos sobre individuos F1 descendientes de machos F0 irradiados como pupas con dosis de 0 y 130 Gy, cruzados con hembras sin irradiar siguiendo la metodología descrita anteriormente para los individuos F0.

Para mejorar la eficiencia en la obtención de insectos para ser utilizados en la técnica del insecto estéril se está llevando a cabo la puesta a punto para el acondicionamiento de adultos fríos para su posterior irradiación. Para ello pupas de *T. absoluta* separadas por sexo se acondicionan en bandejas plásticas y se colocaron en condiciones controladas de T: 24±1 °C, HR: 60±1 % y 14:10 (L:O) hasta la emergencia de los adultos. Posteriormente se enfrían y se irradian con 150 Gy y tasa de dosis de 34 Gy/min en la Planta de Irradiación Semi Industrial (PISI) del Centro Atómico Ezeiza (CAE), con una fuente de cobalto 60 (60^{Co}), utilizando dosímetros de alanina. Se observó en los individuos irradiados F0 y en su descendencia F1, una notoria desorganización de los núcleos del esperma, un aumento en la proporción de euespermatozoides anormales siendo mayor en los irradiados con mayor dosis respecto del control. Con respecto a la transferencia de esperma se observó que los individuos irradiados transfieren menos esperma eupireno que los controles sin irradiar. Considerando los resultados obtenidos en los ensayos, la identificación de paquetes eupireno deformes podría ser utilizada para monitorear la presencia de machos irradiados ulteriormente a la liberación en el campo y evaluar la efectividad de la EH para esta plaga.

Publicaciones

Yusef, M.V.; Viscarret, M.M.; Michelin, S.C.; Britos, H.L.; Solís, A.; Pawlak, S.E.; López, S.N. 2014. Determinación del rango de dosis de radiación gamma para generar esterilidad heredada en la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). XL Reunión Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear (AATN), 01-05 de diciembre de 2014. Buenos Aires, Argentina.

Yusef, M.V.; Viscarret, M.; Michelin, S.C.; Britos, H.L.; Solís, A.; Pawlak, S.E.; López, S.N. 2015. Generación de Esterilidad Heredada en la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) utilizando radiación gamma. IX Congreso Argentino de Entomología, 19-22 de mayo de 2015. Posadas, Misiones, Argentina.

- Yusef, M.V.; López, S.N.; Michelin, S.C.; Britos, H.L.; Solis, A.; Pawlak, S.E.; Malter Terrada, M. 2015. Alteraciones morfológicas en paquetes de esperma eupireno en la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) por efecto de la radiación gamma. XLII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear (AATN), 30 de noviembre al 4 de diciembre de 2015. Buenos aires, Argentina.
- Yusef, M. V., Viscarret, M., López, S.N., Michelin, S., Britos, H., Solis, A., Pawlak, E. and M. Malter Terrada. 2017. Gamma Radiation Dose to Generate Inherited Sterility in Tomato Leaf Miner *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). Third FAO–IAEA International Conference on Area-wide Management of Insect Pests: Integrating the Sterile Insect and Related Nuclear and Other Techniques, 22-26 de mayo de 2017. Viena, Austria.
- Yusef, M.V.; López, S.N.; Michelin, S.C.; Britos, H.L.; Solis, A.; Malter Terrada, M.; Pawlak, E.S. 2018. Efecto de la Radiación Gamma sobre la Morfología de los Euespermatozoides de Machos de la Polilla del Tomate *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). X Congreso Argentino de Entomología, 21-24 de mayo de 2018. Mendoza, Mendoza, Argentina.

Proyecto con el que se cofinanció la actividad

Proyecto INTA-IAEA N° 16332. Development of the Sterile Insect Technique to control the tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) (financiado por la Agencia Internacional de Energía Atómica). 2010-2014.

El presente libro reúne los trabajos técnicos desarrollados durante el Proyecto Específico PNPV1135033 "Desarrollo de herramientas para el manejo integrado de artrópodos perjudiciales", del Programa Nacional de Protección Vegetal del INTA. Se presentan abreviados los principales resultados obtenidos a lo largo de los 4 años y 9 meses de desarrollo de este proyecto.

Esperamos, que estas páginas sean un aporte de información para el perfeccionamiento de métodos de control biológico, microbiano, genético y comportamental de invertebrados plaga que contribuyan de manera decisiva en el área del Manejo Integrado de Plagas (MIP) y sus distintas tácticas de control.



Secretaría
de Agroindustria



Ministerio de Producción y Trabajo
Presidencia de la Nación