

Control microbiano de la chinche del tallo del arroz,  
*Tibraca limbativentris* Stal. 1860 (Hemiptera:  
Pentatomidae) con hongos entomopatógenos.

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de  
Buenos Aires, Área Producción Vegetal con Orientación en Protección de  
Cultivos*

**Raúl Daniel Kruger**

Ingeniero Agrónomo – Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) - 2008

Lugar de trabajo:

- Estación Experimental Agropecuaria Corrientes – Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria (EEA Corrientes – INTA)

- Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA - CICVyA - INTA Castelar)



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

## COMITÉ CONSEJERO

Consejero Principal de tesis

**Roberto Eduardo Lecuona**

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Córdoba)

Master en Ciencias Biológicas, Especialidad: Entomología (Univ. de Sao Paulo, Brasil)

Doctor en Zoología (Universidad Pierre et Marie Curie - Paris VI, Francia)

Consejero

**Marín Alfredo Rubén**

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Nordeste)

Magister Scientiae, Agronomía (Louisiana State University - USA)

Doctor of Philosophy, Agronomía (Louisiana State University - USA)

Consejero

**Marcelo Aníbal Carmona**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

## JURADO DE TESIS

JURADO

Nancy Greco

Licenciada en Biología - Orientación Zoología (Universidad Nacional de La Plata)

Doctora en Ciencias Naturales (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO

Román Serrago

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor de la Universidad de Buenos Aires, área Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 22 de ABRIL de 2014

**DEDICATORIA**

A Dios                                Quien estuvo conmigo en cada momento y pasos de mi vida.

A mis padres                        Fernández Zulma A. y Kruger Daniel R. A ustedes por el amor, apoyo, educación y eterna confianza, están dedicados este y todos mis logros, así como yo se que cada lucha en sus vidas ha sido para mis hermanos/as y para mí.

A mi pareja Gabriela              Por la amistad, comprensión y paciencia, por el incentivo y por no dejarme desistir nunca, por el amor y por hacerme feliz.

A mis hermanas/os                Gisela, Soledad, Nahuel, Nicolás y Susana, a quienes siempre los tengo presente.

A mis suegros y cuñados        Por estar siempre allí, quiero compartir este logro con ustedes.

Dedico mi trabajo a la búsqueda del conocimiento que contribuya de forma progresiva al mejoramiento de la calidad de vida de la población.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios por darme la vida, esta profesión y proveer para que este sueño sea una realidad, y a todas las personas que fueron parte de este paso tan importante en mi vida.

A los integrantes y amigos del Grupo de investigación del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (LHE) del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) de INTA Castelar, en especial a Posadas Julieta, Mini Ignacio, Angulo Lewylle Maricel, Nussenbaum Ana L., Oyarzun Martin Pini y Gómez Diego Gustavo, gracias por recibirme, por su amistad, confianza, colaboración y apoyo en mi formación profesional y desarrollo del trabajo.

A mi director de tesis, por la orientación y apoyo durante mi formación profesional, además, del espacio brindado en su grupo de trabajo.

A mis co-directores de tesis, Marín Alfredo, Kraemer Alejandro, Carmona Marcelo, por la orientación, amistad, y su disposición e incentivo en mi formación profesional.

A los colegas del grupo de Agricultura Extensiva de la Estación Experimental Agropecuaria - EEA Corrientes - INTA, Méndez Miguel, Moulin Juan, Pachecoy María Inés, Herber Luciana y Bertollo Javier, por creer en mí, darme confianza, por su amistad y consejos tan precisos y acertados en los momentos difíciles y felices de mi vida, que han hecho de mi una mejor persona y profesional integral.

Al compañero, colega y amigo Rampoldi Andrés, con quien hemos compartido estos años dedicados a la maestría.

A todos los compañeros y amigos de los cursos de post-grado que se cruzaron en mi camino y compartieron un poco de sí.

A las siguientes personas por brindar su apoyo y tiempo durante los muestreos: Abascal Gustavo de la Arrocera COPRA S.A., Moreyra Pablo de la Arrocera Irundy S.A., Udaquiolla Sebastian de la Arrocera Storti, Romero Oscar de la Arrocera Sandoval, Bonin Jorge Rafael de la Arrocera La Cachuera y Vañek Pedro de la Arrocera Vañek.

**DECLARACIÓN**

*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

---

Kruger, Raúl Daniel

DNI.: 31.266.590

**PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**

**Kruger, R.D.; Rampoldi, A.; Posadas, J.; Nussenbaum, A.; Lecuona, R. 2012.** Selección de hongos entomopatógenos para el control de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) y determinación concentración letal (CL<sub>50</sub>) para la cepa promisor. XIV Jornada Fitosanitaria Argentina, 2012, Potrero de los Funes, San Luis. Resúmenes Protección Vegetal, pp. 60.

**Kruger, R.D.; Rampoldi, A.; Nussenbaum, A.; Lecuona, R. 2012.** Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre huevos y ninfas de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). XIV Jornada Fitosanitaria Argentina, 2012, Potrero de los Funes, San Luis. Resúmenes Protección Vegetal, pp. 94.

**Kruger, R.D.; Posadas, J.; Lecuona, R. 2012.** Aislamiento de hongos presentes en adultos de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). XIV Jornada Fitosanitaria Argentina, 2012, Potrero de los Funes, San Luis. Resúmenes Protección Vegetal, pp. 86.

**Kruger, R. D.; Marín, A.; Kraemer, A.; Nuñez, F.; Lecuona, R. 2013.** Estudio del comportamiento de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) durante la época invernal. VIII Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2013. 12 a 15 de Agosto de 2013. Park Hotel Morotin, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Kruger, R.D.; Posadas, J.; Lecuona, R. 2013.** Compatibilidad de productos fitosanitarios utilizados en el cultivo del arroz con una cepa de *Metarhizium anisopliae*, seleccionada para el control microbiano de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). XIII Congreso Argentino de Microbiología. 23 al 26 de septiembre de 2013, Palais Rouge, Buenos Aires, Argentina.

**Kruger, R.D.; Marín, A.; Kraemer, A.; Posadas, J.; Lecuona, R. 2013.** Control Microbiano de la chinche del tallo del arroz, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) mediante el uso de hongos entomopatógenos. X Edición Premio ArgenINTA. Categoría 1: Investigación y desarrollo en el área de tecnología de alimentos. Fecha Convocatoria: 25/6/13 al 27/09/13. Mención especial: 17 de diciembre del 2013 - Hotel Claridge - Ciudad de Buenos Aires.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
DECLARACIÓN.....	iii
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS .....	iv
INDICE DE TABLAS .....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xii
CAPITULO 1 .....	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.2 REVISION DE LA LITERATURA .....	4
1.2.1 Generalidades de la chinche del tallo del arroz .....	4
1.2.2 Taxonomía de <i>T. limbativentris</i> .....	5
1.2.3 Ciclo biológico y descripción morfológica de <i>T. limbativentris</i> .....	5
Huevo.....	6
Ninfa .....	6
Ninfa 1° estadio .....	6
Ninfa 2° estadio .....	6
Ninfa 3° estadio .....	7
Ninfa 4° estadio .....	7
Ninfa 5° estadio .....	7
Adulto .....	8
1.2.4 Biología y hábitos de <i>T. limbativentris</i> .....	11
1.2.5 Daños producidos por <i>T. limbativentris</i> en el cultivo del arroz .....	12
1.2.6 Métodos de Control de <i>T. limbativentris</i> .....	13
a) Control químico .....	13
b) Control cultural .....	14
c) Control biológico.....	14
d) Control microbiano.....	15
1.2.7 Generalidades de los hongos entomopatógenos.....	16
1.2.8 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.....	17
a) Adhesión.....	18
b) Germinación .....	18
c) Penetración .....	19
d) Multiplicación del hongo en el hemocele.....	20
e) Producción de toxinas .....	20
f) Muerte del artrópodo.....	21
g) Colonización total .....	21
h) Emergencia del hongo hacia el exterior .....	21
i) Esporulación .....	22
1.2.9 Efectos subletales de los hongos entomopatógenos.....	22
1.2.10 Factores que intervienen en el desarrollo de los hongos entomopatógenos.....	23
a) Temperatura .....	23
b) Humedad relativa.....	24
c) Radiación solar UV.....	25
1.2.11 Propiedades de los hongos entomopatógenos .....	25
1.2.12 <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo - Cribelo) Vuillemin 1912 .....	25

1.2.13 <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff, 1879) Sorokin .....	27
1.3 OBJETIVOS .....	29
1.3.1 General.....	29
1.3.2 Específicos.....	29
1.4 HIPÓTESIS .....	30
CAPITULO 2 .....	31
Muestreo, Recolección y Aislamiento del Material Experimental.....	31
2.1 INTRODUCCIÓN .....	31
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.2.1 Recolección de material experimental y determinación de zonas de hibernación .....	33
2.2.2 Cría y mantenimiento de chinches en laboratorio.....	35
2.2.3 Aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de adultos de <i>T. limbativentris</i> .....	36
a) Desinfección.....	36
b) Incubación.....	37
c) Conservación.....	37
d) Aislamiento .....	37
2.3 RESULTADOS Y DISCUSION .....	38
2.3.1 Recolección de material experimental y determinación de zonas de hibernación .....	38
2.3.2 Cría y mantenimiento de chinches en laboratorio.....	45
2.3.3 Aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de adultos de <i>T. limbativentris</i> .....	46
CAPITULO 3 .....	48
Bioensayos para seleccionar la cepa promisoras para el control de <i>Tibraca limbativentris</i> .....	48
3.1 INTRODUCCIÓN .....	48
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
3.2.1 Bioensayos .....	52
3.2.1.1 Selección de hongos entomopatógenos para el control de <i>T. limbativentris</i> .....	52
3.2.1.2 Evaluación de la virulencia de la cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> sobre adultos de <i>T. limbativentris</i> .....	54
3.2.2 Evaluación de la compatibilidad de cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> con productos fitosanitarios .....	55
3.2.3 Producción masiva de la cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> sobre diversos sustratos en fermentación en medio sólido (FMS).....	56
<i>Multiplicación del hongo en medio de cultivo artificial</i> .....	56
<i>Multiplicación del hongo en medio sólido</i> .....	56
<i>Secado de los conidios</i> .....	57
<i>Separación de los conidios del sustrato</i> .....	57
<i>Evaluaciones realizadas</i> .....	58
3.2.4 Selección de coadyuvantes de formulación según su compatibilidad con la cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> .....	59
3.2.5 Ensayos de diferentes formulaciones experimentales sobre la viabilidad en el almacenamiento de conidios de la cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> .....	60
3.2.6 Evaluación en condiciones controladas de la eficacia de los micoinsecticidas sobre adultos de <i>T. limbativentris</i> .....	62
3.3 RESULTADOS Y DISCUSION .....	65



3.3.1 Bioensayos.....	65
3.3.1.1 Selección de hongos entomopatógenos para el control de <i>T. limbativentris</i> .....	65
3.3.1.2 Evaluación de la virulencia de la cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> sobre adultos de <i>T. limbativentris</i> .....	67
3.3.2 Evaluación de la compatibilidad de cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> con productos fitosanitarios .....	68
3.3.3 Producción masiva de la cepa Ma 72 sobre diversos sustratos en fermentación en medio sólido (FMS).....	72
3.3.4 Selección de coadyuvantes de formulación según su compatibilidad con la cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> .....	76
3.3.5 Ensayos de diferentes formulaciones experimentales sobre la viabilidad en el almacenamiento de conidios de la cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> .....	77
3.3.6 Evaluación en condiciones controladas de la eficacia de los micoinsecticidas seleccionados en invernáculo sobre <i>T. limbativentris</i> .....	81
CAPITULO 4 .....	86
4.1 DISCUSION GENERAL .....	86
4.2 CONCLUSIONES .....	89
4.3 NUEVAS LINEAS DE INVESTIGACION .....	90
BIBLIOGRAFIA .....	91

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Producción de arroz en Argentina en el ciclo agrícola 2011/12 .....	1
<b>Tabla 2:</b> Valores de parámetros biológicos obtenidos para <i>Tibraca limbativentris</i> (Stal., 1980) según diferentes autores .....	10
<b>Tabla 3:</b> Muestreo en la Provincia de Corrientes .....	34
<b>Tabla 4:</b> Número de adultos hibernantes de <i>T. limbativentris</i> colectados durante la época de post-cosecha (Julio-Agosto) en campos arroceros.....	38
<b>Tabla 5:</b> Valores de parámetros biológicos obtenidos para <i>Tibraca limbativentris</i> (Stal., 1980) durante su cría sobre plantas de arroz variedad Fortuna INTA.....	46
<b>Tabla 6:</b> Cepas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bb), <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Pl) y <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma), recolectados en campos arroceros .....	47
<b>Tabla 7:</b> Origen de los aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> (Bb), <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Pl) y <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) evaluados sobre adultos de <i>T. limbativentris</i> .....	52
<b>Tabla 8:</b> Productos fitosanitarios usados comúnmente en el cultivo del arroz y utilizados en los bioensayos de compatibilidad con la cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> ....	55
<b>Tabla 9:</b> Coadyuvantes de formulación analizados .....	59
<b>Tabla 10:</b> Ensayo de formulaciones a diferentes temperaturas de almacenamiento .....	60
<b>Tabla 11:</b> Ensayo de eficacia en condiciones de invernáculo .....	63
<b>Tabla 12:</b> Valores de UFC por mililitro de Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> con herbicidas e insecticidas usados comúnmente en el cultivo del arroz .....	69
<b>Tabla 13:</b> Producción de conidios de Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre diferentes sustratos sólidos.....	73
<b>Tabla 14:</b> Porcentaje de germinación (%) de conidios de Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> producidos sobre diferentes sustratos sólidos .....	76
<b>Tabla 15:</b> Germinación de conidios de Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> mezclados con diferentes concentraciones de coadyuvantes de formulación .....	77
<b>Tabla 16:</b> Viabilidad (%) de conidios de Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> de las formulaciones en base a Polvo Mojable (PM) y Concentrado Emulsionable (CE) a diferentes temperaturas de almacenamiento, 24 horas después de la incubación a 25 ± 0,5 °C. Viabilidad inicial: 97 %.....	78
<b>Tabla 17:</b> Mortalidad confirmada (%) de <i>Tibraca limbativentris</i> por la cepa Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> , bajo condiciones de invernáculo en la EEA Corrientes – INTA. ....	81
<b>Tabla 18:</b> Supervivencia media (días) de <i>Tibraca limbativentris</i> después de aplicado la cepa Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> , bajo condiciones de invernáculo en la EEA Corrientes – INTA .....	85

## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1:</b> Chinche del tallo del arroz, <i>Tibraca limbativentris</i> . Estado de Huevo: <b>a)</b> Huevos recién puestos, <b>b)</b> huevos después de una semana de la postura y <b>c)</b> restos de huevos sin la ninfa.....	8
<b>Fig. 2:</b> Chinche del tallo del arroz, <i>Tibraca limbativentris</i> . Estado Ninfal: <b>a)</b> Ninfa de 1° estadio, <b>b)</b> Ninfa de 2° estadio, <b>c)</b> Ninfa de 3° estadio y <b>d)</b> Ninfa 5° estadio.....	9
<b>Fig. 3:</b> Chinche del tallo del arroz, <i>Tibraca limbativentris</i> . <b>a)</b> Adulto Joven, <b>b)</b> adulto viejo y <b>c)</b> Hembra (Izquierda) y Macho (Derecha) .....	9
<b>Fig. 4:</b> Chinche del tallo del arroz, <i>Tibraca limbativentris</i> . <b>a)</b> Adultos y ninfas alimentándose de macollos de arroz <b>b)</b> Daños en la fase vegetativa “Corazón muerto”; <b>c)</b> Daños en la fase reproductiva temprana “Panoja blanca” y <b>d)</b> Daños en la fase reproductiva tardía. ....	13
<b>Fig. 5:</b> Ciclo patogénico de los hongos pertenecientes al orden de los Hypocreales (Bustillo et al., 2011). ....	17
<b>Fig. 6:</b> Estructura de fructificación de <i>B. bassiana</i> . Imagen de G. L. Barron.....	26
<b>Fig. 7:</b> Estructuras de fructificación de <i>M. anisopliae</i> .....	28
<b>Fig. 8:</b> Estructuras de fructificación de <i>M. anisopliae</i> bajo microscopio óptico, teñidas con azul de algodón en lactofenol de Ammann 0,5 % p/v (400 X). Imagen Posadas y Lecuona, 2009 .....	28
<b>Fig. 9:</b> Zonas de muestreo Invernal (Julio-Agosto 2011): <b>a)</b> Rastrojo de arroz en pie; <b>b)</b> Campo natural aldeaño; <b>c)</b> Lote laboreado (1 rastra de disco); <b>d)</b> Taipa Ronda.....	33
<b>Fig. 10:</b> Cría de <i>T. limbativentris</i> : <b>a)</b> Preparación macetas con arroz; <b>b)</b> Sala de cría acondicionada; <b>c)</b> Huevos recién puestos; <b>d)</b> Huevos de una semana postura; <b>e)</b> Ninfas eclosionados; <b>f)</b> Ninfas de 5° estadio obtenidos a partir de la cría. ....	36
<b>Fig. 11:</b> Especies vegetales presentes de mayor frecuencia en las taipa ronda (TR) al momento de los muestreos invernales de chinches adultas de <i>T. limbativentris</i> .....	41
<b>Fig. 12:</b> Especies vegetales presentes de mayor frecuencia en los lotes de arroz pie (LAP) al momento de los muestreos invernales de chinches adultas de <i>T. limbativentris</i> .....	42
<b>Fig. 13:</b> Especies vegetales presentes de mayor frecuencia en los Campos Naturales aldeaños (CN) al momento de los muestreos invernales de chinches adultas de <i>T. limbativentris</i> .....	43
<b>Fig. 14:</b> Especies vegetales bajo las cuales se encontraron adultos de <i>T. limbativentris</i> en los muestreos invernales.....	45
<b>Fig. 15:</b> Cadáveres de chinches adultas de <i>T. limbativentris</i> halladas en los muestreos: <b>a)</b> Muerta por <i>Beauveria bassiana</i> (Bb), <b>b)</b> Muerta por <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) y <b>c)</b> Muerta por <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Pl) .....	47
<b>Fig. 16:</b> Experimento I. Selección de Cepas. <b>a)</b> Suspensión fúngica; <b>b)</b> Adultos después de sumergidos en la suspensión; <b>c)</b> y <b>d)</b> Unidades experimentales .....	54
<b>Fig. 17:</b> Suspensiones de la cepa Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> mezclados con distintas dosis de agroquímicos: <b>a)</b> Suspensiones puestas en agitación constante durante 16 hs; <b>b)</b> Luego de las 16 hs de agitación y previo a la siembra en placa .....	56
<b>Fig. 18:</b> Producción de la cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> en fermentación en medio solido: <b>a)</b> Diferentes sustratos esterilizados; <b>b)</b> Secado de las esporas (conidios); <b>c)</b> Separación del polvo de conidios del sustrato; <b>d)</b> Almacenamiento de conidios en cámara de frío .....	57
<b>Fig. 19:</b> Esquema de producción de la cepa Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	58
<b>Fig. 20:</b> Formulación de la cepa Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> : <b>a)</b> Polvo Mojable (PM): Pre-mezcla de polvo de <i>M. anisopliae</i> más inerte; <b>b)</b> Concentrado Emulsionable	

(CE): Pre-mezcla de polvo <i>M. anisopliae</i> más oleo y coadyuvantes; c) Formulaciones terminadas .....	61
<b>Fig. 21:</b> Material para el ensayo de eficacia: <b>a)</b> Unidades experimentales, plantas de arroz variedad “Fortuna INTA”; <b>b)</b> Formulados de la cepa Ma 72 de <i>M. anisopliae</i> seleccionados para el ensayo de eficacia en condiciones de invernáculo .....	63
<b>Fig. 22:</b> Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>T. limbativentris</i> , para las diversas cepas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) y de <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Pl). .....	66
<b>Fig. 23:</b> Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>T. limbativentris</i> , para las diversas cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma). .....	66
<b>Fig. 24:</b> Proporción de supervivencia acumulada de adultos de <i>T. limbativentris</i> , para las cepas más virulentas de <i>M. anisopliae</i> (Ma). .....	67
<b>Fig. 25:</b> Crecimiento miceliano y esporulación de algunas cepas usadas en el Bioensayo de selección. ....	67
<b>Fig. 26:</b> Porcentaje de Mortalidad de adultos de <i>T. limbativentris</i> para las diversas concentraciones de la cepa Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	68
<b>Fig. 27:</b> Porcentaje de Colonias formadoras de unidades (UFC) de Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> con distintas dosis de herbicidas usados en el cultivo del arroz. ....	70
<b>Fig. 28:</b> Porcentaje de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de Ma 72 de <i>Metarhizium anisopliae</i> con distintos dosis de insecticidas usados en el cultivo del arroz .....	71
<b>Fig. 29:</b> Temperatura media, máxima y mínima diaria (°C) durante los días en los cuales se mantuvo el ensayo de eficacia en condiciones de invernáculo en la EEA Corrientes – INTA, 2013. ....	82
<b>Fig. 30:</b> Humedad Relativa media, máxima y mínima diaria (%) durante los días en los cuales se mantuvo el ensayo de eficacia en condiciones de invernáculo en la EEA Corrientes – INTA, 2013. ....	83
<b>Fig. 31:</b> Radiación fotosintéticamente activa (PAR) media, máxima y mínima diaria (W.m <sup>2</sup> ) durante los días en los cuales se mantuvo el ensayo de eficacia en condiciones de invernáculo en la EEA Corrientes – INTA, 2013. ....	83
<b>Fig. 32:</b> Secuencia de etapas llevadas a cabo para la búsqueda, aislamiento y selección de hongos entomopatógenos para el control microbiano de <i>Tibraca limbativentris</i> .....	87

## RESUMEN

**Título:** Control microbiano de la chinche del tallo del arroz, *Tibraca limbativentris* Stal 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) con hongos entomopatógenos.

El cultivo del arroz es una de las principales actividades productivas en el Nordeste Argentino, el cual se ve afectado por diferentes plagas que reducen su rendimiento y calidad. Entre ellas, la chinche del tallo, *Tibraca limbativentris* es una de las plagas principales. Para su control, el uso de agroquímicos es generalizado, por su conveniencia y eficiencia. Sin embargo, el mal uso de los productos fitosanitarios está ocasionando problemas al ambiente, lo que lleva a la búsqueda de nuevas tecnologías, reduciendo al mínimo los riesgos al ambiente y a la salud humana en particular. En el presente estudio se evalúa el uso de hongos entomopatógenos como una alternativa para reducir la población de *T. limbativentris*. Se realizaron muestreos en diversas zonas arroceras en búsqueda de cepas nativas de hongos entomopatógenos, lográndose aislar 11 cepas de adultos de esta chinche. A través de bioensayos se evaluaron 32 cepas de hongos entomopatógenos sobre adultos y dos de ellas causaron la muerte del 100 % de los mismos. Se seleccionó la cepa Ma 72 de *Metarhizium anisopliae* y se evaluó la compatibilidad con diversos herbicidas usados frecuentemente en la producción de arroz. Se logró producir la cepa sobre diversos sustratos en fermentación en medio sólido (FMS), destacándose el arroz blanco quebrado, sobre el cual se obtuvo  $3,8 \times 10^9$  conidios/gr de sustrato. Se evaluaron diferentes tipos de formulaciones experimentales durante 100 días y la viabilidad se mantuvo sólo bajo condiciones de refrigeración (6 °C). Se evaluó la eficiencia de diversos formulados experimentales sobre adultos de *T. limbativentris* en condiciones de invernáculo, logrando un control satisfactorio (entre 56 y 77 % de mortalidad) a los 30 días. Se concluyó que la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* sería una herramienta promisoriosa para su empleo en el control microbiano de la chinche del tallo *T. limbativentris* y podrían incluirse como parte de un programa de Manejo Integrado de plagas en arroz.

**Palabras clave:** Chinche del tallo del arroz, *Tibraca limbativentris*, arroz, hongos entomopatógenos, cepa nativa, *Metarhizium anisopliae*, control microbiano, FMS, micoinsecticidas.

## ABSTRACT

**Title:** Microbial control of rice-stem bug, *Tibraca limbativentris* Stal. 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) with entomopathogenic fungi.

Rice farming it is one of the main productive activities in Northeast Argentina, which is affected by different pests that reduce their yield and quality. Among them, the stem bug *Tibraca limbativentris* is the most important. For its control, the use of agrochemicals is widespread by its convenience and efficiency. However, the wrong use of synthetic products is causing environmental problems, which leads to the search for new technologies, minimizing the risks to the environment and human health in particular. In the present study we evaluate the use of entomopathogenic fungi as an alternative method to reduce the population of *Tibraca limbativentris*. Samples cadavers were collected at different rice areas in search of native strains of entomopathogenic fungi, achieving to isolate 11 strains from *T. limbativentris* adults. Through bioassays we evaluated 32 isolates of entomopathogenic fungi against *T. limbativentris* adults. Two of this isolates caused the death of 100 %. We selected the isolate Ma 72 of *Metarhizium anisopliae* and we evaluated its compatibility with different herbicides and insecticides used in the production of rice. We produce the promissory isolate on different substrates in solid media fermentation (FMS), highlighting the broken white rice that produced  $3.8 \times 10^9$  conidia/g of substrate. Also, we evaluated different types of experimental formulations for 100 days and observed that the viability was maintained only under refrigerated conditions (6 °C). We evaluated the efficiency of different experimental formulations on *T. limbativentris* adults under greenhouse conditions, achieving satisfactory control (between 56 and 77 % mortality) at 30 days. It is concluded that the isolate Ma 72 of *M. anisopliae* would be a promissory tool for their use in microbial control of the stem bug *T. limbativentris* and could be included as part of an Integrated Pest Management in rice.

**Keywords:** Rice-stem bug, *Tibraca limbativentris*, rice, entomopathogenic fungi, native strain, *Metarhizium anisopliae*, microbial control, FMS, mycoinsecticides.

## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN GENERAL

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el cultivo alimenticio más importante dado que constituye la base de la dieta de más de la mitad de la población mundial (FAO, 2004; FAO, 2012). Se cultivan anualmente alrededor de 155 millones de has, lo que representa aproximadamente el 11 % de las tierras cultivables del mundo (Khush, 2005; FAO, 2012). En América del Sur se siembran cerca de 3,7 millones de has de arroz. Brasil cuenta con un millón de has en Rio Grande do Sul, donde se produce el 60 % del total de la producción brasileña (7 millones de toneladas por año). En Perú se cultivan unas 400.000 has de arroz (2,5 millones de toneladas por año); mientras que tanto en Uruguay como en Argentina se cultivan aproximadamente 200.000 has, lo que representa una producción de 1,3 y 1,5 millones de toneladas anuales, respectivamente (SIIA, 2012).

En Argentina la producción de arroz está concentrada en la región del litoral, principalmente en las provincias de Corrientes y Entre Ríos, que representan, respectivamente, 41 y 33,5 % de la superficie sembrada total; el 25,5 % restante se reparte entre Santa Fe, Formosa y Chaco (Tabla 1; MAGyP, 2012).

Actualmente la producción mundial de arroz se desarrolla en diversos agroecosistemas, predominando el arroz de riego. Este se expandió en las últimas décadas, por ser el más productivo y con mejor calidad de producto, superando el 50 % del área cultivada con arroz, incluyendo más de 100 países, con rendimientos que varían entre 3 a 12 toneladas por ha (Maclean et al., 2002; Bambaradeniya y Amarasinghe, 2003; UrCAMP, 2008).

**Tabla 1:** Producción de arroz en Argentina en el ciclo agrícola 2011/12

Provincia Productora	Superficie Sembrada (ha)	Producción (tn)	Rendimiento (kg/ha)
CHACO	7400	48840	6600
CORRIENTES	97200	628680	6618
ENTRE RIOS	79500	570820	7180
FORMOSA	8100	52650	6500
SANTA FE	44900	250310	5575
ARGENTINA	237100	1551300	6604

Fuente: MAGyP, 2012

El sistema de producción de arroz de riego abriga una diversidad biológica rica mantenida por una rápida colonización, así como una rápida reproducción y crecimiento de los organismos. La fauna comprende plagas, enemigos naturales y otros organismos que habitan en la vegetación, el agua y en el suelo de las arroceras y vegetación circundante (Hook, 1994). Los insectos plagas han sido una de las causas de pérdidas crónicas o epidemias en la producción de arroz de riego. Estas plagas infestan a los campos de arroz desde la época de siembra hasta la cosecha, pudiendo causar perjuicios significativos, entre 20 a 40 % de la producción (Costa et al., 2006; Costa y Link, 1999).

Actualmente, el cultivo del arroz se ve afectado por diferentes artrópodos plagas que atacan al mismo y reducen su rendimiento y calidad. Dentro de estas, la chinche del tallo, *Tibraca limbativentris* Stal. 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) es una de las plagas principales. La misma está distribuida en toda la región arroceras de la Argentina (Trujillo, 1991), en el sur de Brasil y en Bolivia (Cheaney y Jennings, 1975) dañando los tallos del arroz, provocando mermas en los rendimientos y causando serios problemas para los productores. La ocurrencia de *T. limbativentris* está aumentando explosivamente en los campos de arroz, donde la alta densidad de plantas, el clima y el manejo del cultivo favorecen la ocurrencia y el aumento poblacional del insecto (Botton et al., 1996). *T. limbativentris* se localiza en la base de las plantas, entre los tallos, y en preferencialmente en lugares donde no hay lámina de agua (Botton et al., 1996), como ser los puntos altos de los cuadros y en las taipas (bordes de tierra que aseguran la permanencia del agua dentro de los lotes y permiten una lámina de agua uniforme). El control se realiza por medio de insecticidas de alta toxicidad o por mezclas de principios activos (Kraemer et al., 2008).

En los últimos años se han presentado serios problemas para controlar las poblaciones de insectos plagas, ocasionando pérdidas directas por no controlarlas y/o pérdidas indirectas por un mayor uso de insecticidas y consecuentemente un aumento en los costos de producción del cultivo. La realización de aplicaciones sucesivas de los mismos insecticidas favorece el desarrollo de resistencia por parte de los insectos (Omoto, 2000), y ello conduce a la pérdida de eficiencia de los mismos (Castiglioni et al., 2008). Además, la sociedad esta demandando métodos que son menos dañinos al ambiente y a la salud humana. Por ello, es necesario buscar tácticas de control que se adecuen a programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), en donde se realice un control racional de plagas. Algunas de estas tácticas pueden ser la introducción de



plantas resistentes a insectos, el control cultural, la utilización de control biológico y microbiano (Silva y Klein, 1997).

Las condiciones de temperatura y humedad en donde se localiza el insecto son propicias para su desarrollo (Martins y Lima, 1994), pero además, son ideales para el desarrollo de hongos entomopatógenos (Carbonell et al., 1980). Se conoce la ocurrencia natural de enfermedades sobre los insectos de diferentes órdenes, siendo los hongos *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, los entomopatógenos más ampliamente utilizados en el manejo de insectos plagas de importancia en la agricultura (Lecuona, 1996). Estos hongos parasitan artrópodos provocándoles la muerte y de esta manera disminuyen las poblaciones de las plagas y reducen sus perjuicios (Roberts et al., 1991). Las dos especies de hongos ya citadas, son similares en cuanto a la distribución y los mecanismos de patogenicidad e infección, presentando un alto potencial para el desarrollo de control de insectos (Alves, 1998a).

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* infecta insectos de la mayoría de los órdenes y es cosmopolita (Keller y Zimmerman, 1989). Del mismo modo, *M. anisopliae* ha sido descrito parasitando más de 200 especies de insectos, exhibiendo diferentes grados de especificidad, la cual está influenciada por las características del patógeno y de la cutícula del hospedante (Hall y Papierok, 1982). En el desarrollo de sustitutos eficaces para los productos químicos, los hongos entomopatógenos han sido considerados como una alternativa promisoría para la reducción de dichos productos de síntesis (Roessler, 1989, Parella et al., 1997). Particularmente, *M. anisopliae* ha sido observado sobre pentatomidos que atacan al arroz, específicamente sobre la chinche del tallo (*T. limbativentris*) en condiciones naturales y durante el periodo de hibernación de este insecto (Rampelotti et al., 2007a).

En Argentina, no existen reportes de control de esta plaga por medio de hongos entomopatógenos, y tampoco se han realizado aislamientos de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre dicha plaga, sin embargo, en Brasil, Martins y Lima, 1994; Martins et al., 1997; Martins et al., 2004; Rampelotti et al., 2005 y Frizzo et al., 2005 demuestran la eficiencia de algunos hongos entomopatógenos para controlar a este insecto.

Actualmente la Unión Europea (UE) plantea para el 2014 el retiro de varios insecticidas y herbicidas en relación con nuevas políticas (91/414 CEE), en donde el MIP será obligatorio para toda la agricultura de la UE, lo que llevará a que este sistema de manejo sea adoptado a nivel mundial (Birch et al., 2011). Ya en Latinoamérica el uso

de bioplaguicidas se está incrementando, en particular por el crecimiento en superficie de sistemas de agricultura orgánica o ecológica, integrada y/o responsable. Existe varios antecedentes de MIP de esta chinche, como ser diversas prácticas de control cultural (destrucción de rastrojos, aradas profundas, siembras escalonadas, etc.), de control biológico (uso de aves y de la presencia de potenciales artrópodos agentes de control como parasitoides de huevos y predadores), de control químico con insecticidas, basados en el umbral de daño económico y de control microbiano, como ser el uso de hongos entomopatógenos (Meneses et al., 2008). Estas prácticas favorecen la reducción poblacional de la chinche del tallo del arroz, *T. limbativentris*.

Con el aumento de infestaciones de *T. limbativentris*, principalmente en los campos de la provincia de Corrientes (Trujillo, 1991; Kruger et al., 2012), se torna necesaria la adopción de estrategias que permitan optimizar el control de este insecto, viendo la posibilidad de minimizar el uso de productos fitosanitarios convencionales y potenciar el manejo con hongos entomopatógenos considerados como una alternativa.

Por lo antes mencionado en este trabajo se estudió la utilización de micoplaguicidas basados en hongos entomopatógenos nativos para reducir los niveles poblacionales de la chinche del tallo, contribuyendo a la sustentabilidad de los sistemas arroceros y previniendo futuros problemas ambientales y de contaminación en alimentos. Según Campbell (1989) para este proceso de desarrollo de un agente de control microbiano es necesario alcanzar el desarrollo de varias etapas, tales como: búsqueda de microorganismos asociados al insecto, aislamiento e identificación del organismo benéfico, pruebas de eficacia y estabilidad, preservación de cepas, producción masiva, formulación, pruebas sobre estabilidad de almacenamiento, evaluación del costo del producto, investigación de mercado, comercialización y distribución del agente biológico.

## **1.1 REVISION DE LA LITERATURA**

### ***1.2.1 Generalidades de la chinche del tallo del arroz***

La chinche del tallo, *T. limbativentris* Stal. 1860 (Hemiptera: Pentatomidae), es una plaga que está distribuida en toda la región arroceros de la Argentina (Trujillo, 1991), dañando al cultivo del arroz y causando serios problemas para los productores arroceros. Según Martins et al., (2004a), todos los años se registran grandes poblaciones

de esta plaga bajo condiciones de monocultivo, alta densidad de plantas, lotes con mayor presencia de taipas (terrenos inclinados) y con una menor lámina de agua de riego dentro de los lotes. En la provincia de Corrientes, estas condiciones se observan con mayor frecuencia en la región Centro Sur (Mercedes) que se caracteriza por la presencia de lomadas lo que implica un mayor número de taipas. En las zonas productoras del Noroeste de la provincia (Itá Ibaté) que presentan grandes planicies, los focos de esta plaga se observan principalmente cerca de la vegetación nativa o próximos a las taipas, en las zonas con mayor densidad de plantas o donde la lámina de riego es más baja. Actualmente con el aumento de la siembra directa en el cultivo de arroz (Vara y Marín, 2008), el volumen de rastrojo acumulado hace que sea más complicada la eliminación de esta plaga por medio de labores culturales y ha provocado un aumento de la población en lotes manejados de esta manera (Link, 1998).

### ***1.2.2 Taxonomía de T. limbativentris***

Posee la siguiente clasificación sistemática:

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Familia: Pentatomidae

Especie: *Tibraca limbativentris* (Stal. 1980)

Nombres comunes:

En Argentina: Chinche del tallo del arroz, chinche marrón, chinche grande del arroz (Rizzo, 1976).

En Brasil: Percevejo do colmo do arroz (Ferreira y Martins, 1984), Percevejo marrom (Campos, 1982).

En Bolivia: Petilla (Terán, 1971).

En Colombia: Chinche hedionda (González et al., 1983)

Su traducción al inglés: Rice stalk stink bug, Rice-stem bug.

### ***1.2.3 Ciclo biológico y descripción morfológica de T. limbativentris***

*T. limbativentris* es un insecto fitófago de gramíneas, pero principalmente del cultivo del arroz. Su ciclo biológico es heterometabólico, es decir, se desarrolla pasando

por fases de huevo, ninfa y adulto. Considerando los datos obtenidos por diferentes autores, son necesarios alrededor de 58 días para iniciar una nueva generación (Kishino, 1993; Trujillo, 1970; Botton et al., 1996; Silva et al., 2004) (Tabla 2).

### **Huevo**

Los huevos tienen forma cilíndrica y miden aproximadamente 1 mm de largo por 0,8 mm de diámetro. Son colocados en grupos de 23 a 68 y dispuestos alternadamente en dos a seis hileras (Trujillo, 1970). Inicialmente son de coloración verdosa y se van oscureciendo a medida que se aproxima la eclosión de las ninfas (Fig. 1).

### **Ninfa**

Esta fase consta de cinco estadios de duración variables ya que están influenciados por la temperatura. En condiciones de días largos y a 25 °C, son necesarios alrededor de 43 días para ninfas que originaran machos y 45 días para ninfas que darán lugar a hembras (Kishino, 1993), mientras que se necesitan aproximadamente 80 días a una temperatura de 20 °C.

#### **Ninfa 1° estadio**

Este estadio dura aproximadamente 6 días (Silva et al., 2004) y todas las ninfas se mantienen agrupadas. Miden alrededor de 1,5 mm de longitud y 1 mm de ancho. Presentan la cabeza con antenas filiformes de cuatro artículos, siendo los últimos más voluminosos y formando un conjunto de coloración más clara. Los ojos son bien visibles y de coloración roja oscura. Los primeros dos segmentos del tórax son más desarrollados que el tercero y los tres son de coloración marrón con reflejos verdes, al igual que las patas. El abdomen tiene tres manchas marrones en la línea media dorsal sobre un fondo de coloración amarilla y verde, y en los extremos 8 pequeñas manchas marrones de cada lado dispuestas en hileras; en la parte ventral muestra una mezcla de colores verde (dominando en el centro) y amarillo (dominando en la parte extrema). (Ferreira et al., 1997) (Fig. 2a).

#### **Ninfa 2° estadio**

Este estadio dura aproximadamente 8 días (Silva et al., 2004). Miden alrededor de 2,3 mm de longitud y 1,5 mm de ancho. En este estadio las ninfas comienzan a dispersarse. Presenta la cabeza con pequeñísimos puntos, antenas con delicados pelos principalmente en el último segmento que es de coloración verde mientras que los tres restantes son de color marrón claro. Los ojos salientes y rojos oscuros. En la parte dorsal del tórax presenta pequeños puntos, mayormente verdes, semejantes a los de la cabeza. La coloración verde también es dominante en la parte ventral. El abdomen tiene

tres manchas grandes en la línea media dorsal y pequeñas manchas marginales, marrones claras, sobre un fondo verde que predomina en toda la parte ventral (Ferreira et al., 1997) (Fig. 2b).

#### **Ninfa 3° estadio**

Este estadio dura aproximadamente 11 días (Silva et al., 2004). Miden alrededor de 4 mm de longitud y 2,2 mm de ancho. Presentan una cabeza con puntos tan diminutos que se tornan marrón oscuro, antenas marrones oscuras con pequeñísimos pelos irregularmente distribuidos en los cuatro segmentos; ojos salientes y rojo opaco. El tórax tiene puntuaciones marrones claras, sobre un fondo blanco amarillo, en la parte dorsal. El abdomen tiene tres manchas dorsales, cuyo color es una mezcla de marrón y amarillo, sobre un fondo colorido, semejando al del tórax, un poco más claro, que se extiende también por toda la parte ventral (Ferreira et al., 1997). Este estadio se caracteriza por ser muy activo y prefieren dirigirse a la base de los tallos de plantas jóvenes (Trujillo, 1991) (Fig. 2c).

#### **Ninfa 4° estadio**

Este estadio dura aproximadamente 16 días (Silva et al., 2004). Miden alrededor de 5,5 mm de longitud y 3,2 mm de ancho. La cabeza generalmente blanco amarillenta, con puntos marrones oscuros. Las antenas marrones oscuras, con pelos finos. Los ojos son grandes y marrones. La parte dorsal del tórax tiene una coloración semejante a la cabeza. El pronoto y mesonoto son mayores que el metanito. El abdomen tiene puntos de color marrón claro sobre un fondo blanco brillante, tanto la parte dorsal como la ventral. Las manchas dorsales y las triangulares del conexivo son de coloración marrón oscura con mezcla de amarillo; seis espiráculos negros están dispuestos en cada lateral (Ferreira et al., 1997). Se insinúan los estuches alares que caracterizan al adulto. Este estadio prefiere macollos más gruesos (Trujillo, 1991).

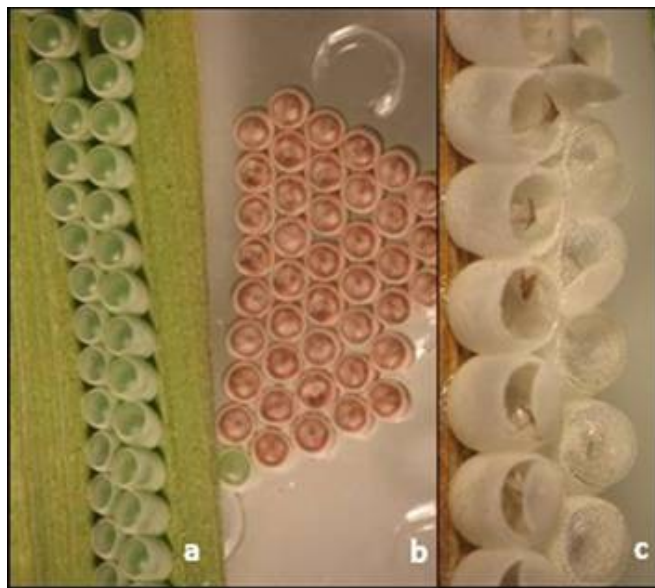
#### **Ninfa 5° estadio**

Este es el estadio más largo y dura aproximadamente 20 días (Silva et al., 2004). Miden alrededor de 9,5 mm de largo por 6,5 mm de ancho. La cabeza presenta una superficie blanco amarilla con puntuaciones grises oscuras y antenas negras brillantes. El tórax tiene una superficie colorida semejante a la cabeza, manchas redondas blanco amarillentas, dos en el centro del pronoto (una de cada lado de la línea media) y tres en la parte anterior del mesonoto (una encima de la línea media y una de cada lado de esta). Las tecas alares son bien visibles. El abdomen es negro brillante con diez manchas

triangulares y manchas grandes en el dorso de una mezcla gris oscura y naranja. La parte ventral presenta cuatro pequeñas manchas negras (Ferreira et al., 1997) (Fig. 2d).

### Adulto

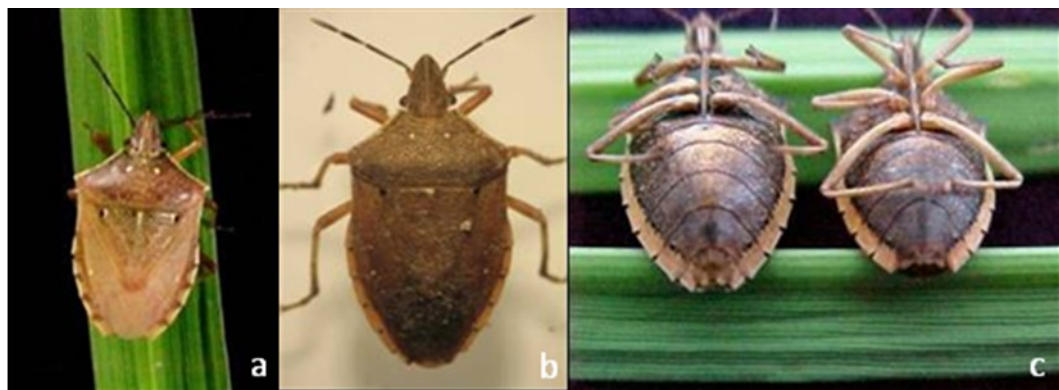
Se diferencia de las formas juveniles por presentar alas totalmente desarrolladas y antenas de cinco segmentos (Trujillo, 1991). Posee cabeza triangular, marrón, con puntuaciones negras y bordes naranjas, ojos salientes, marrones oscuros con un contorno blanco amarillento; dos ocelos rojos oscuros localizados un poco más atrás que los dos ojos compuestos; antenas del color de la cabeza, de aproximadamente 5,5 mm de largo, con 5 segmentos pilosos, de los cuales el tercero es de mayor tamaño. El tórax tiene un pronoto bien desarrollado, marrón con laterales amarillos brillantes y punteado como las demás partes dorsales; escutelo triangular, con un ápice semi-redondeado; hemiélitros de la longitud del abdomen, cada uno con un punto amarillo; patas totalmente marrones con tarsos trímeros (en el estado ninfal son dímeros). El abdomen está cubierto por el escutelo y hemiélitros, con apenas el conexivo visible, el cual es marrón y posee cuatro manchas negras de cada lado. El cuerpo del adulto, en general es de color marrón claro en la parte dorsal y marrón oscuro en la parte ventral, con una faja clara en el margen del abdomen. Las hembras son más grandes y miden aproximadamente 13,7 mm de largo y 7,4 mm de ancho y los machos miden aproximadamente 12,5 mm de largo por 7,1 mm de ancho (Costa Lima, 1940) (Fig. 3).



**Fig. 1:** Chinche del tallo del arroz, *Tibraca limbativentris*. Estado de Huevo: **a)** Huevos recién puestos, **b)** huevos después de una semana de la postura y **c)** restos de huevos sin la ninfa.



**Fig. 2:** Chinche del tallo del arroz, *Tibraca limbativentris*. Estado Ninfal: **a)** Ninfa de 1° estadio, **b)** Ninfa de 2° estadio, **c)** Ninfa de 3° estadio y **d)** Ninfa 5° estadio



**Fig. 3:** Chinche del tallo del arroz, *Tibraca limbativentris*. **a)** Adulto Joven, **b)** adulto viejo y **c)** Hembra (Izquierda) y Macho (Derecha)

**Tabla 2:** Valores de parámetros biológicos obtenidos para *Tibraca limbativentris* (Stal., 1980) según diferentes autores

Parámetros biológicos	Unidad	Kishino, 1993***		Trujillo, 1970*		Botton, et al., 1996**		Silva, et al., 2004****	
		25 °C ± 1 °C	19 a 23 °C	25,3 °C; 61,3 % HR	14 hs fotofase	26 °C ± 1 °C; 68 % HR	26 °C ± 1 °C; 60 % HR ± 10 %	26 °C ± 1 °C; 60 % HR ± 10 %	14 Hs fotofase
Maduración sexual de los machos	días	-	-	-	-	-	-	-	11,3 ± 6,86
Maduración sexual de las hembras	días	-	-	-	-	-	-	-	14,2 ± 7,48
Periodo de pre-oviposición	días	29,2	17,6	6	6	11,2	9,9	-	-
Periodo de oviposición	días	9,8	30,4	18,9	18,9	-	-	-	39,2 ± 30,3
Número de posturas/hembra		3	8,1	3	23 - 68	36,5	40,2	-	5,5 ± 1,02
Número de huevos/postura		11,7	13,7	23 - 68	23 - 68	-	-	-	16,6 ± 3,7
Número de huevos/hembra		35,3	162,9	47,5	47,5	763,1	932,1	-	91,2 ± 27,4
Longevidad de hembras	días	22,2	73,1	18,9	18,9	76,3	81,5	-	59,3 ± 25,2
Longevidad de machos	días	22,1	75,1	25,1	25,1	93,8	138,6	-	68,5 ± 23,6
Relación sexual (n° hembras/(n° hembras + n° machos))		-	-	1:1	1:1	0,95:1	0,95:1	-	0,55
Número de generaciones anuales		-	-	3 a más	3 a más	2 a 3	2 a 3	-	-

\* Estudios realizados a partir de insectos que estaban en plena actividad a campo, en la Estación Experimental Agropecuaria de Corrientes, Argentina, localizada 27°29'S y 58°46'W, en condiciones de invernadero, utilizando el arroz cultivar Fortuna-INTA, en el período de septiembre de 1969 a febrero de 1970.

\*\* Estudios realizados en Embrapa Clima Templado, Capao de Leao-RS-Brasil, utilizando plantas de raygrass (*Loitium molitiflorum*) y un cultivar de arroz BR Irga 409, en condiciones de invernáculo.

\*\*\* Estudios realizados en Embrapa Cerrados, Brasília-DF-Brasil, localizada a 15°30'S y 48°45'W, altitud de 1000 m, en condiciones de laboratorio, en el período de abril a septiembre de 1990.

\*\*\*\* Estudios realizados en Embrapa Cerrados, Brasília-DF-Brasil, localizada a 15°30'S y 48°45'W, altitud de 1000 m, en condiciones de laboratorio, durante el año 2003, sobre la variedad de arroz BRS Formoso.



#### 1.2.4 Biología y hábitos de *T. limbativentris*

Algunos estudios de comportamiento de la chinche del tallo demuestran que los lugares de hibernación ocurren con mayor frecuencia fuera del lote, en las partes más elevadas como taipas rondas o barrancas cubiertas por gramíneas, que normalmente circundan a los campos de arroz (Trujillo, 1991; Prando et al., 1993; Prando, 2003). La chinche del tallo se abriga, preferentemente, en grupos de gramíneas, tales como cola de zorro (*Andropogon* spp.), capín, y otras presentes cerca de las chacras. Si estas plantas no están presentes, la chinche busca otras especies que forman grupos con masa foliar densa como por ejemplo *Paspalum urvillei*, *Eringium eburneum* y *Erianthus* sp. (Oliveira et al., 2005). Cuanto más denso sea el grupo o la arquitectura de las plantas, mayor será la preferencia de la chinche por esas especies. Los sitios menos preferidos son aquellos cubiertos por una vegetación rala o arbustiva (Link, 1997; Prando et al., 2003). La diapausa permite a los insectos la sobrevivencia durante períodos adversos que ocurren en la época invernal debido a factores ambientales como: fotoperiodo, temperatura y humedad (Tauber et al., 1986). El ingreso a los sitios de hibernación está regulado principalmente por un acortamiento en el fotoperiodo y un descenso de la temperatura. Los insectos hibernantes se ubican en la parte inferior de las plantas y en los meses de baja temperatura no se mueven. La población de insectos encontrada en los lugares de refugio varía en función de los meses del año, la mayor concentración ocurre en los meses de Abril a Septiembre. Es un período de aproximadamente 5 meses, en el cual elevados niveles poblaciones de este insecto están concentrados en algunos lugares específicos, facilitando la adopción de medidas de control (Prando et al., 2003).

El abandono de los sitios de hibernación por las chinches ocurre con el aumento de las horas de luz (días más largos), aumento de la temperatura o por la búsqueda de alimento (Mielitz et al., 1993). Esta misma época coincide con la fase de macollamiento en la mayor parte del área arroceras. La chinche del tallo se localiza en las áreas de mayor densidad de plantas, puntos altos de los cuadros y en crestas de las taipas, preferencialmente donde no hay lámina de agua y se ubica en la parte basal entre los tallos posicionándose cabeza para abajo (Botton et al., 1996) (Fig. 4a). En caso de que la lámina de agua sea elevada hasta cubrir las 2/3 partes de la altura de la planta, en la fase inicial del macollamiento la chinche del tallo queda expuesta sobre las hojas del arroz y la misma se vuelve vulnerable a los predadores, pero esto acarrea un debilitamiento de la planta y una reducción en el número de macollos formados. En la fase reproductiva,

con una lámina de agua menor a 10 - 15 cm, las chinches pasan a ubicarse en la parte basal de las plantas (Prando et al., 2003). La colocación de huevos de las chinches normalmente ocurre en las hojas de la región basal de la planta de arroz. En caso de que los huevos queden sumergidos en la lámina de agua por un periodo superior a tres días pueden tornarse inviables. Los huevos son colocados en número y formas variables, desde algunos hasta cerca de 60 huevos, dispuestos de 2 a 6 hileras. Las ninfas recién eclosionadas permanecen por dos días junto a los huevos, si se dispersan, mueren y su dispersión natural ocurre solamente después de la primera ecdisis (segundo estadio). Los principales daños en el cultivo del arroz son causados por ninfas y adultos de la primera y segunda generación. Los lugares preferenciales dentro del campo son los de mayor densidad de arroz, sin riego o con una lámina de agua baja. Martins et al., (2004a) observaron que la chinche del tallo presenta una distribución agrupada dentro del campo, dispersándose solamente para el apareamiento y reproducción.

#### ***1.2.5 Daños producidos por *T. limbativentris* en el cultivo del arroz***

Este insecto tanto en su estado de adulto como en los últimos estadios ninfales causa grandes perjuicios al arroz, es de difícil control y ataca en varias etapas del cultivo (Ferreira et al., 1986), dañando las plantas desde el inicio de la fase de macollamiento pudiendo matarlas o afectar el número de macollos. Los daños son originados por la alimentación de las chinches adultas y de las ninfas a partir del 2° estadio ninfal cuando éstas perforan los tejidos del tallo de las plantas con su aparato bucal (rostró) al momento que inyectan saliva tóxica, provocando la lisis de los tejidos aledaños al punto de succión (pequeño punto de coloración marrón), esto causa un estrangulamiento del tallo, interrumpiendo el flujo de savia y resultando en el marchitamiento o muerte del tallo por encima del punto picado. Conforme a lo relatado por Trujillo (1970), el resto de la planta no muere, pero su crecimiento es retardado. Si el daño producido por *T. limbativentris* ocurre en la fase vegetativa del arroz el síntoma es conocido como “corazón muerto” debido a que causa la muerte de macollos. Si el daño es provocado entre la fase de elongación del tallo y formación de panojas (fase reproductiva), el síntoma es conocido “panoja blanca”, y ocasiona un aborto parcial o total de la misma dependiendo del momento en el cual ocasione el daño (Costa y Link, 1992) (Fig. 4b-d). Un período de 12 a 24 horas de alimentación del insecto es suficiente para ocasionar los dos tipos de síntomas (Ferreira et al., 1997).



**Fig. 4:** Chinche del tallo del arroz, *Tibraca limbativentris*. **a)** Adultos y ninfas alimentándose de macollos de arroz **b)** Daños en la fase vegetativa “Corazón muerto”; **c)** Daños en la fase reproductiva temprana “Panoja blanca” y **d)** Daños en la fase reproductiva tardía.

En un estudio del efecto de diferentes poblaciones de machos de *T. limbativentris* sobre el cultivar BR-IRGA 409, se observó que infestaciones en la fase reproductiva aumentaron el número de granos quebrados y yesosos. En este trabajo se concluyó que 1 chinche/m<sup>2</sup> en la fase vegetativa provoca una reducción del rendimiento de 58,7 kg/ha y en la fase reproductiva de 65,2 kg/ha.

En condiciones favorables para el insecto, se estima que de cada ninfa de 4° y 5° estadio y de cada adulto establecido en cultivos con 30 y 65 días de edad son capaces de provocar, en los 35 días subsecuentes, 6 corazones muertos y 5 panojas blancas, respectivamente (Embrapa, 2008).

#### **1.2.6 Métodos de Control de *T. limbativentris***

##### **a) Control químico**

Es el método de control más comúnmente usado contra esta plaga, que consiste en aplicaciones de insecticidas en concentraciones adecuadas para causar la muerte de la misma. Se utilizan aquellos insecticidas recomendados e inscriptos para ser usados en el cultivo del arroz (Kraemer et al., 2008). Antes de la aplicación de los mismos se deben realizar monitoreos a partir de 40 a 50 días de emergido el cultivo para corroborar si la población del insecto esta cerca del valor de daño económico (Ferreira et al., 1997). Las aplicaciones se deben realizar cuando se presentan una o más chinches por 100 tallos, o cuando son colectados en promedio un número igual o mayor que 0,3 a 0,5 chinches por

paso de red de 0,38 x 0,8 m, antes o después del mediodía, respectivamente (Embrapa, 2008). El uso indiscriminado de insecticidas resulta en un aumento innecesario del costo de producción y promueve el aumento de poblaciones de insectos resistentes a insecticidas, la eliminación de insectos benéficos, mayor presencia de residuos de insecticidas en el ambiente, mayor riesgo de toxicidad para la meso y macro fauna y la población humana (Khan et al., 1989).

#### ***b) Control cultural***

Esta práctica se basa principalmente en la eliminación de las chinches en hibernación presentes en plantas hospederas dentro y fuera de los lotes (Trujillo, 1970). Oliveira et al., (2005) sugieren para eliminar las chinches hibernantes hacer una arada profunda, destruir restos de cultivo, incorporar o quemar el rastrojo. Por otro lado, Ferreira y Martins (1984) recomiendan evitar la siembra escalonada de arroz en áreas próximas y una siembra anticipada de arroz en lotes que van a ser utilizados como cultivos trampas. En complemento a estas medidas, Ferreira (1995) sugiere mantener el interior y los márgenes de las chacras libres de plantas que puedan hacer de hospederas de plagas. Actualmente con el aumento de la siembra directa en el cultivo de arroz, se ha vuelto más complicada la eliminación de esta plaga por medio de labores culturales, lo que ha provocado un aumento de la población de chinches en estos lotes (Link, 1998; Meneses et al., 2008).

#### ***c) Control biológico***

El control biológico puede definirse como la utilización o el manejo de enemigos naturales u organismos benéficos nativos o introducidos (predadores, parasitoides, entomopatógenos, antagonistas, competidores, etc.), con el fin de reducir las poblaciones y efectos de los organismos plaga (insectos, malezas, fitopatógenos). El hecho que un organismo logre llegar al *status* de plaga, hace obvio que las condiciones climáticas y otros factores le sean razonablemente favorables; por lo que uno de los mejores medios para modificar las condiciones ambientales que tiendan a disminuir permanentemente la población de una plaga, es el uso de enemigos naturales (Rose y DeBach, 1992).

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es una estrategia comprendida dentro de la visión sustentable de la agricultura y entre las tácticas que involucra para el control de insectos se cuentan el Control Químico, Cultural, Físico-Mecánico, Etológico, Fitogenético y Biológico. Las posibilidades del control biológico se relacionan con el

uso de los enemigos naturales de las plagas. En particular, el uso o manejo de patógenos de insectos (entomopatógenos) para reducir las poblaciones y los efectos de las plagas, define una rama del control biológico conocida como control microbiano, donde se incluyen a virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos entomopatógenos.

En Argentina el control de plagas en el cultivo de arroz, se realiza básicamente mediante el uso de productos fitosanitarios convencionales. Los estudios de control biológico de la chinche del tallo del arroz, son escasos y menos aún concluyentes. Existen reportes de datos de presencia de enemigos naturales (Martins et al., 2004a). Entre estos, Silva et al., (1968) en Brasil y Rizzo (1976), en Argentina, reportan varios parasitoides de huevos para *T. limbativentris*, entre ellos *Oencyrtus fasciatus* (Mercet) (Himenoptera: Encyrtidae) y *Telonomus* sp. (Himenoptera: Scelionidae). Riffel et al., (2010) constatan la ocurrencia de *Telonomus podisi* y *Trissolcus urichi* (Himenoptera: Scelionidae) en huevos de *T. limbativentris*. Trujillo (1991), menciona a la mosca del genero *Efferia* sp., conocida como “mosca asesina” por su manifiesta voracidad, al atrapar y devorar varios adultos en su vida útil. Otro método citado por Prando et al., (2003) es la utilización de patos (*Anas* sp.) para el control de adultos de *T. limbativentris*.

#### **d) Control microbiano**

La manipulación de microorganismos entomopatógenos para obtener reducciones en las poblaciones de insectos plaga ha sido la meta de los entomólogos interesados en el estudio de los artrópodos y sus enfermedades. Se ha reconocido por muchos años que el control microbiano de insectos y ácaros ocurre continuamente en la naturaleza, como parte del complejo control biológico natural, presentando a menudo epizootias de enfermedades que ayudan en la supresión de las poblaciones de insectos. Los rápidos avances de la Patología de Insectos en las últimas décadas han dado por consecuencia una mejor valoración del papel que juegan los patógenos de insectos en el control natural, y se ha desarrollado un creciente interés en la posibilidad de utilización extensiva de microorganismos para el control de artrópodos plaga (Hall y Papierok, 1982). Los hongos entomopatógenos han demostrado un potencial considerable como control microbiano de insectos, especialmente cuando están incluidos en programas de MIP (Lacey y Goettel, 1995). En consecuencia, la posibilidad de utilización de hongos entomopatógenos para el control de la chinche del tallo es una alternativa que debe ser evaluada. Entre las ventajas que tiene el uso de hongos entomopatógenos se citan: la

posibilidad de asociación con otros métodos de control, la utilización de las mismas maquinas convencionales empleadas para la aplicación de productos químicos, la no contaminación del medio ambiente y sin riesgo de intoxicación para el hombre y/o los animales (Alves et al., 1998b). Cabe resaltar que los hongos entomopatógenos no son perjudiciales para el hombre u otros animales de sangre caliente porque difícilmente se puedan desarrollar en el rango de temperatura de los diferentes mamíferos, que es de 34,5 a 44 °C. Pruebas realizados con los principales hongos entomopatógenos en porcinos, conejos y ratas demostraron que los animales no presentaron anormalidades patológicas, clínicas o histológicas (Alves, 1986).

Los hongos entran en contacto con el insecto y sus conidios se adhieren al tegumento, germinan sobre él, penetran en su organismo y absorben los nutrientes provocando su muerte. El interior del insecto queda colonizado por el hongo tomando un aspecto rígido y finalmente termina saliendo al exterior del cuerpo del artrópodo y se disemina al ambiente. Los hongos, según las cepas consideradas, llevan 14 horas para germinar y entre cinco y siete días para matar al insecto (Alves, 1986).

### ***1.2.7 Generalidades de los hongos entomopatógenos.***

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos ampliamente estudiados en todo el mundo, existiendo más de 700 especies reunidas en 100 géneros. Ellos tienen la particularidad de parasitar diferentes tipos de artrópodos (insectos y ácaros) y de encontrarse en los hábitats más variados (Lecuona et al., 1996). Estos hongos parasitan a artrópodos provocándoles la muerte y de esta manera disminuyen las poblaciones de las plagas y reducen sus perjuicios (Roberts et al., 1991).

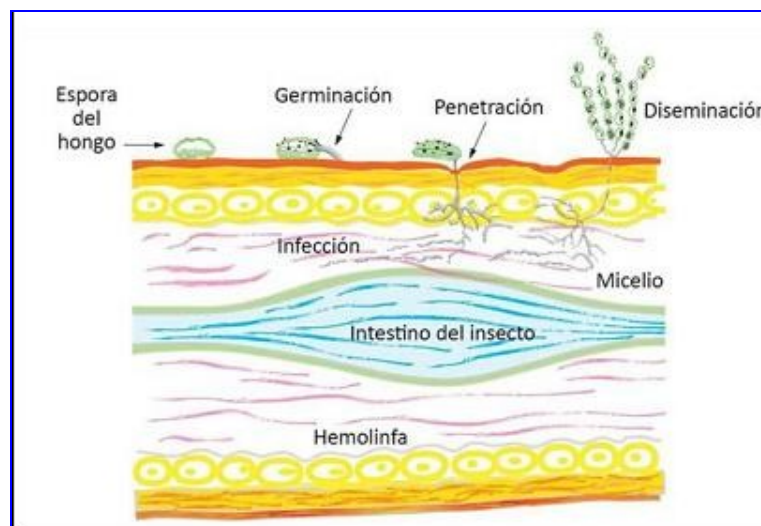
Con respecto a su utilización como agentes de control microbiano, la característica distintiva de los hongos entomopatógenos es su capacidad de infectar al insecto hospedante por penetración a través del tegumento. Esto constituye un modo de acción “por contacto”, independiente del hábito alimenticio del insecto, y por lo tanto, amplía el potencial espectro de aplicación de los hongos con respecto al de los demás entomopatógenos, que en su mayoría actúan “por ingestión” (Silvie y Papierok, 1991; Roberts et al., 1991). El carácter patogénico de los hongos, además, involucra una serie de eventos fisiológicos que considerados en conjunto, permiten suponer que la aparición de resistencia en insectos susceptibles sea menos probable (Hedegus y Khachatourians, 1995).

Los hongos patógenos de insectos más estudiados son los pertenecientes al orden de los Hypocreales que incluye a las familias Cordycipitaceae (*Beauveria*) y Clavicipitaceae (*Metarhizium*, *Isaria* (= *Paecilomyces*), *Hirsutella*, *Lecanicillium* (= *Verticillium*) y *Nomuraea*). El orden de los Entomophthorales también ha sido ampliamente estudiado, y en él se agrupan los hongos que comúnmente producen epizootias en el campo (*Zoophthora*, *Pandora*, *Entomophthora*).

En particular, los géneros, *Beauveria* y *Metarhizium* son considerados patógenos “no especialistas” de plagas, ya que infecta insectos de la mayoría de los órdenes y estos hongos están presentes en distintos ambientes, incluyendo el suelo (Keller y Zimmerman, 1989). De esta manera estos hongos son los más utilizados en el control microbiano de insectos plagas. En la actualidad diversos países ya cuentan con bioinsecticidas registrados de estas especies para el control de plagas sobre diversos cultivos hortícolas, forestales, frutales, etc. (Faria y Wraight, 2007).

### 1.2.8 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.

Los hongos pertenecientes al orden de los Hypocreales alternan una fase biotrófica (parasitismo) dentro del hemocele del hospedador, con una fase saprofitica, colonizando el cuerpo muerto del hospedador (Fig. 5).



**Fig. 5:** Ciclo patogénico de los hongos pertenecientes al orden de los Hypocreales (Bustillo et al., 2011).

En el ciclo patogénico, el contacto entre el inóculo del entomopatógeno y el artrópodo es fundamental para el inicio del proceso infeccioso. La epicutícula o capa

más externa del integumento del hospedante es el sitio inicial de la interacción patógeno-hospedante. En general en el proceso de la patogénesis (micosis), se observan 10 etapas (Lecuona et al., 1996):

#### **a) Adhesión**

Es un fenómeno que permite la fijación de los propágulos o unidades infectivas sobre la superficie del hospedante por medio de mecanismos donde intervienen propiedades físicas, químicas y electrostáticas del patógeno y el hospedante. Esta etapa consta de tres fases. La primera fase es la adsorción o inmovilización del microorganismo sobre la superficie, es una unión pasiva donde intervienen factores físicos y químicos del substrato como fuerzas de Van der Waals y electrostáticas. En segundo lugar se da la fase de contacto donde la interacción entre el patógeno y el hospedante está en función de la capacidad del propágulo de emitir microextensiones activas que refuercen las uniones electrostáticas entre ambas superficies. La tercera y última fase es la consolidación de esta interfase y se llama adhesión; ésta puede ser pasiva y no específica, sin requerimiento de energía; o activa y específica, necesitando de cofactores y de energía, iones, carbohidratos, lípidos, glucoproteínas, etc. La adhesión es un paso importante en el proceso patogénico y ha sido correlacionado con la especificidad del patógeno por el hospedante (Lecuona et al., 1996).

#### **b) Germinación**

Se entiende por germinación el proceso mediante el cual un conidio emite uno o varios tubos germinativos, los cuales por crecimiento y alargamiento dan origen a las hifas (Volcy y Pardo, 1994). La germinación de los conidios depende en gran parte de la humedad ambiental y la temperatura, y en menor grado, de las condiciones de luz y nutricionales (Tanada y Kaya, 1993). Una vez que el conidio se ha hidratado y adherido sobre el tegumento, germina emitiendo un tubo germinativo con formación, en algunos casos, de un apresorio, para posteriormente penetrar al insecto. La función del apresorio puede ser la de debilitar la cutícula en sus puntos de contacto, fijación al tegumento durante la penetración, o simplemente, se puede considerar al apresorio como un paso de transición entre el tubo germinativo y el pico de penetración que es una célula especializada que atraviesa el tegumento del hospedante (Butt, 1990). En general, los conidios de un hongo entomopatógeno pueden presentar cuatro comportamientos germinativos diferentes sobre la cutícula del hospedante:

- puede emitir un tubo germinativo, generalmente corto, que perforará el tegumento;



- puede emitir un tubo germinativo largo, con un comportamiento errante sobre la superficie y que aparentemente no es capaz de penetrar a través del tegumento;
- puede darse la emisión de un tubo germinativo más o menos corto y en cuya extremidad se forma un conidio secundario, de tamaño y forma diferente a la del primario; por último,
- puede suceder que el conidio no sea capaz de germinar.

Los factores climáticos y los requerimientos nutricionales del patógeno juegan un papel importante en el proceso germinativo. El hecho que una cepa germine sobre el tegumento de un artrópodo se lo considera como un fenómeno ligado a la especificidad parasitaria, debido a que la composición del tegumento varía dentro y entre las especies (Al-Aidroos y Roberts, 1978; Pekrul y Grula, 1979; Latgé et al., 1982; Vey et al., 1982). Sin embargo, se ha demostrado que esto no puede ser generalizado y depende de la relación hospedante-patógeno considerada (Milner, 1982; Boucias y Latgé, 1988; Delmas, 1988; Lecuona et al., 1991).

### **c) Penetración**

La penetración de la cutícula del insecto por conidios germinados ocurre como resultado de una combinación entre la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo (Gillespie, 1988). El modo de penetración principalmente depende de las propiedades de la cutícula: grosor, esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley, 1984). Es notable la fuerza mecánica ejercida en el extremo de una hifa invasora donde la capa cuticular es deformada por presión (Tanada y Kaya, 1993). Se produce un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija a la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se produce la penetración al interior del cuerpo del insecto. En la penetración participan mecanismos físicos y químicos. El primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de proteasas, lipasas y quitinasas, que causan la degradación del tejido en la zona de penetración, lo que facilita la penetración física (Monzón, 2001).

Las enzimas descubiertas en el tubo germinativo son proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterases, y N-acetil-glucosamidasa (quitinasas). Estudios *in vitro* indicaron que la digestión del integumento sigue una secuencia de lipasa-proteasa-quitinasa (Tanada y Kaya, 1993). Gillespie, (1988) reportó que los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces* spp. y *V. lecanii*, producen grandes cantidades de proteasas

y quitinasas en medios de cultivo líquido. La producción de proteasa, lipasa y quitinasa sobre la cutícula del insecto, se ha demostrado en *M. anisopliae* mediante coloración de enzimas específicas, recuperadas de moscas previamente inoculadas con conidios del hongo. En varios aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* la enzima principal es una endoproteasa que disuelve la proteína matriz que cubre la quitina cuticular. Por lo tanto, la producción de quitinasa ocurre después del proceso de infección y una vez que el hongo atraviesa la cutícula debe vencer el sistema inmunológico del hospedero antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del artrópodo.

Los hongos pueden también infectar artrópodos a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas de los mismos. Puesto que la humedad no es un problema en el tracto alimenticio los conidios pueden germinar rápido en este ambiente; por otra parte, los fluidos digestivos pueden destruir los conidios o las hifas germinativas. En algunos casos, la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por micosis (Charnley, 1984).

#### **d) Multiplicación del hongo en el hemocele**

Una vez en el interior del artrópodo, el hongo se multiplica principalmente por gemación, dando formas miceliales libres y unicelulares llamadas blastosporas. También se producen en el hemocele hifas y protoplastos o células sin pared (Prasertphon y Tanada, 1968; Tyrrell, 1977). El principal mecanismo de defensa de los artrópodos frente a los propágulos de hongos es la encapsulación, la cual se produce por la concentración de plasmocitos o granulocitos alrededor del punto de infección, logrando así formar una masa pseudotisular llamada granuloma (Vey, 1971; Vey y Vago, 1971). Se ha demostrado que los conidios de los hongos entomopatógenos fagocitados o encapsulados tienen la capacidad de germinar (Hou y Chang, 1985).

#### **e) Producción de toxinas**

No todos los hongos ni todas las cepas de una especie fúngica producen toxinas en el hemocele de los artrópodos. Estas son sustancias que pueden, en ciertos casos, originar la muerte del artrópodo debido a sus propiedades insecticidas pero además, ellas actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del hospedante por alteraciones de los hemocitos y retardo en la agregación de las células de la hemolinfa (Vey y Gotz, 1986). Las toxinas que producen estos hongos son de dos tipos: macromoléculas proteicas, que son enzimas extracelulares secretadas en cantidades significativas en medios de cultivo o en el interior del hospedador; y las toxinas de bajo

peso molecular, que son metabolitos secundarios cuya producción es una propiedad genética de cada hongo.

Las principales toxinas de este último grupo son los ciclodepsipéptidos producidos por *B. bassiana* y *M. anisopliae*, siendo las más comunes las beauvericinas y las destruxinas, producidas respectivamente por los hongos citados (Roberts, 1966). Aún hoy se discute sobre el rol de las micotoxinas en la virulencia de hongos entomopatógenos sobre diversos artrópodos. La literatura disponible contiene muy pocas evidencias con respecto a la acción directa de las micotoxinas en la infección de los insectos.

#### **f) Muerte del artrópodo**

La muerte de un artrópodo parasitado por un hongo *Hypocreal* ocurre generalmente antes de que el hongo colonice todo el interior del hemocele, en parte por la acción de las sustancias tóxicas secretadas por el hongo. La muerte del hospedador marca el final de la fase parasítica para continuar creciendo saprofiticamente por todos los tejidos, compitiendo con la flora bacteriana intestinal del artrópodo. El tiempo que demanda la muerte del hospedante depende de la cepa, del artrópodo y de los factores ambientales. Se pueden observar cambios en su comportamiento normal antes de la muerte y cuando esto ocurre no se observan aún signos visibles de una enfermedad fúngica (Lecuona et al., 1996).

#### **g) Colonización total**

Luego de la muerte, el micelio invade todos los órganos y tejidos, comenzando en ciertos casos por el tejido graso. Después de la colonización total (aunque en algunos casos el hongo llega a respetar algunos tejidos como glándulas, músculos y tráqueas (Pekrul y Grula, 1979)), el cadáver se transforma en una momia resistente a la descomposición bacteriana. Este cadáver sirve como reservorio del hongo, en donde éste supera las condiciones adversas que puedan presentarse (Madelin, 1963; Ferron, 1981).

#### **h) Emergencia del hongo hacia el exterior**

El hongo se encuentra formando una gran masa de micelio en el interior del hospedante, manteniendo intacto su tegumento. Puede permanecer de esta forma en cuanto las condiciones de humedad relativa sean bajas. En cambio, en ambientes húmedos y cálidos logrará atravesar nuevamente el tegumento, pero esta vez desde el interior hacia el exterior del artrópodo. Generalmente emerge por las regiones menos

esclerosadas del tegumento, pero esto dependerá del hospedante y de su estado de desarrollo (Lecuona et al., 1996).

### **i) Esporulación**

Una vez que las hifas atraviesan el tegumento pueden quedar en esta etapa vegetativa o pasar a la reproductiva dentro de las 24 a 48h con formación de conidios, si las condiciones de humedad relativa del entorno son altas. El artrópodo pasa entonces a tomar una coloración que será característica para cada especie fúngica.

### **1.2.9 Efectos subletales de los hongos entomopatógenos**

Si bien la muerte del hospedador es el resultado más frecuente en las infecciones causadas por hongos entomopatógenos, no se le debe restar importancia a los efectos subletales causados por ellos sobre los artrópodos. Así por ejemplo, la fiebre comportamental es uno de estos efectos y consiste en la elevación de la temperatura corporal por encima de la temperatura normal en artrópodos infectados; éstos buscan lugares en el ambiente que se hallen a temperaturas más elevadas, con el fin de matar o suprimir al patógeno. En consecuencia, esta fiebre es una respuesta común de los hospedadores hacia varios tipos de entomopatógenos (Moore, 2002).

Muchos estudios han investigado los efectos de la infección fúngica en la alimentación de los artrópodos hospedadores. Estos muestran que aunque los artrópodos mueren por la infección con hongos entomopatógenos, proceso que generalmente toma mayor tiempo que el requerido por los plaguicidas químicos, el daño en los cultivos puede disminuir durante el tiempo de incubación de la enfermedad debido a que los artrópodos infectados se alimentan menos que los sanos. La mayoría de los estudios investigaron especies de artrópodos infectados con hongos pertenecientes al orden de los Hypocreales, *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp., y demostraron una reducción significativa en la alimentación durante los primeros cuatro días luego de la inoculación con el hongo (France et al., 2002; Tefera y Pringle, 2003). Se han enunciado hipótesis que indican que la reducción en la alimentación podría deberse, al menos en parte, a sustancias tóxicas secretadas o a la disrupción mecánica causada por estos hongos (Cheung y Grula, 1982; Samuels et al., 1988).

El *fitness* de un individuo depende directamente del número de descendientes viables que este produce, y tanto el patógeno como el hospedador adoptan estrategias para maximizar su eficacia reproductiva. Los hongos entomopatógenos producen tanto

efectos directos en la fecundidad como cambios en la producción y en la respuesta a las feromonas sexuales. La reducción en la fecundidad puede incrementar el *fitness* del patógeno al desviar los recursos del hospedador, tales como la energía, hacia el patógeno. Estudios en hongos Hypocreales han demostrado que los hospedadores infectados generalmente producen menor progenie (Blanford y Thomas, 2001; Baverstock et al., 2006). Los cambios en la producción de feromonas sexuales han sido observados principalmente en insectos infectados con hongos pertenecientes al orden Entomophthorales (Furlong et al., 1995; Reddy et al., 1998). Nussenbaum y Lecuona (2012a) evaluaron el efecto de la infección fúngica sobre el comportamiento de alimentación de los adultos del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* y observaron una reducción en el peso de los adultos infectados con la cepa Ma 20 de *M. anisopliae*, también el número medio de puntos de alimentación difirió del testigo a las 72 y 96 horas de tratados.

#### **1.2.10 Factores que intervienen en el desarrollo de los hongos entomopatógenos**

Una gran variedad de factores ambientales tanto bióticos como abióticos afectan la supervivencia, propagación e infectividad de los hongos entomopatógenos. El calor (temperatura), la humedad y la radiación solar UV son serios obstáculos cuando se utilizan estos hongos en ambientes naturales, ya que los conidios pueden perder su capacidad germinativa luego de unas pocas horas de radiación solar (Fargues et al., 1996, 1997; Rangel et al., 2004, 2005).

##### **a) Temperatura**

La temperatura causa desorganización en las células de la membrana y de la pared, inactivación del metabolismo respiratorio (Crisan, 1973), desnaturalización proteica (Setlow y Setlow, 1995), y estrés oxidativo por el incremento de los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno (Privalle y Fridovich, 1987; Guerzoni et al., 2001). La mayoría de los hongos entomopatógenos tienen un amplio rango de tolerancia a la temperatura, pero las óptimas para la infección, el crecimiento y la esporulación son usualmente mucho más restringidas. La temperatura óptima para el crecimiento del hongo no es la misma que para el desarrollo de la enfermedad, por lo tanto la temperatura es determinante para el crecimiento micelial y el avance de la infección (Pérez, 1997). En este sentido, el máximo desarrollo, germinación y esporulación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* ocurre entre los 20 y 30 °C, siendo el

óptimo a los 28 °C. Sin embargo entre los 15 y 35 °C se observa un buen porcentaje de germinación, pero con más de 35 °C este proceso se ve retrasado (Pacheco, 2002). Nussenbaum y Lecuona (2012b), observaron el efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial de dos cepas de *B. bassiana* y una de *M. anisopliae* seleccionado para el control del picudo del algodón (*A. grandis*) y concluyeron que la tasa de crecimiento más alta estaba en 27 °C para todos los aislamientos; a los 30 y 35 °C, la cepa de *M. anisopliae* mostró una tasa de crecimiento superior a las de *B. bassiana*, y todas fueron inhibidas a 38 °C. Lecuona et al., (2001), evaluaron el efecto de diferentes temperaturas (18, 22, 26, 30, y 34 °C) y humedades relativas (35 y 90 % de HR) sobre la mortalidad de las ninfas de la vinchuca *Triatoma infestans* causada por *B. bassiana*, y observaron que la mortalidad más alta ocurrió con una temperatura de 26 °C, mientras que la humedad relativa no afectó a la mortalidad de las ninfas de *T. infestans*.

#### **b) Humedad relativa**

El uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas agrícolas ha sido limitado por el estrecho rango de humedad relativa en la cual ocurre la germinación del conidio y la infección del hospedante, tanto en ambiente protegido como en condiciones de campo. La humedad ambiental afecta en gran medida a la mayoría de los procesos de los hongos tanto internos (desarrollo e invasión) como externos (germinación y esporulación) que se dan en su hospedante. En el caso de la germinación se requieren altos porcentajes de humedad que van del 90 al 100 %; cuando el nivel de humedad se encuentra por debajo del 90 % decrece la germinación de los conidios (Camargo, 2000). Luz y Fargues (1997) demostraron usando estudios *in vitro*, que la temperatura y humedad afectan la germinación de *B. bassiana*. Con una humedad relativa por debajo de 90 % y a 25 °C se impide la germinación de los conidios. Walstad et al., (1970) observaron que el porcentaje de germinación, crecimiento y esporulación de conidios (24 horas después de la inoculación) de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* requiere de humedad relativa por encima del 92,5 %; la germinación óptima, crecimiento y esporulación ocurrió al 100 %. Según Hajek et al., 1996 e Inglis et al., 1996 estos datos no se pueden extender a situaciones *in vivo*. Al respecto, Lecuona et al., (2001) no observaron diferencias en la mortalidad de las ninfas de *T. infestans* causadas por diversas cepas de *B. bassiana* bajo dos condiciones de humedad relativa, 35 y 90 %. Según Luz y Fargues, (1998) la humedad relativa es más importante para la esporulación fúngica en cadáveres de insectos que para la penetración e infección por los hongos. Por lo tanto, ambientes con baja humedad relativa presenta un obstáculo

para el desarrollo de epizootias, ya que se disminuye la esporulación y la propagación del hongo (Fargues y Luz, 1998; Luz y Fargues, 1998). Sin embargo, esta condición de baja humedad relativa, puede no ser crítica para el uso de los hongos como bioinsecticidas porque el microclima adecuado para promover las infecciones se puede encontrar en las membranas intersegmentales de la cutícula de los insectos (McCauley et al., 1968; Doberski, 1981; Ramoska, 1984; Marcandier y Khachatourians, 1987; James et al., 1998) como en el poro genital y el ano en las garrapatas (Samish y Rehacek, 1999).

### **c) Radiación solar UV**

Un componente importante del ambiente que influye en la supervivencia de los hongos entomopatógenos es el flujo diario de la radiación solar, la cual incluye la radiación visible, la radiación ultravioleta y la radiación infrarroja (Lindow et al., 2004). La radiación ultravioleta (200 a 400 nm) tiene el mayor contenido de energía y constituye aproximadamente el 7 % de la radiación solar, la cual es potencialmente perjudicial para la microbiota presente en el suelo.

#### **1.2.11 Propiedades de los hongos entomopatógenos**

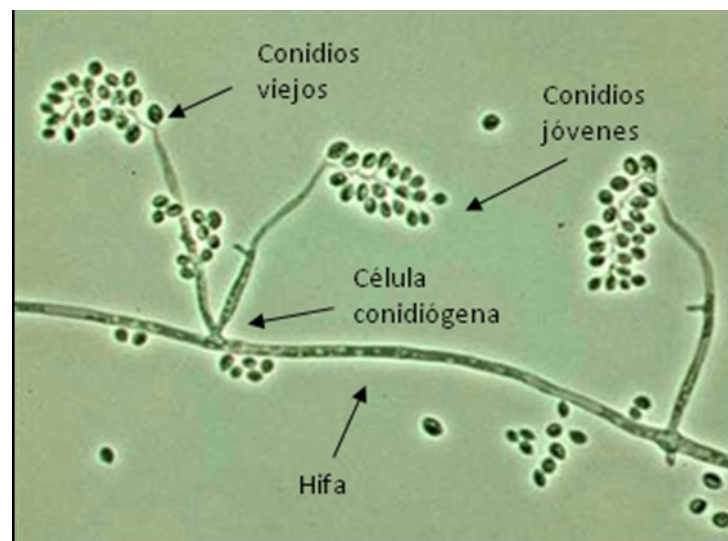
Entre las propiedades individuales y de una población de entomopatógenos que pueden favorecer la ocurrencia de epizootias se encuentran: patogenicidad, virulencia, dispersión, supervivencia en el ambiente, densidad y distribución espacial del inoculo. La patogenicidad se refiere a la habilidad de un organismo para causar enfermedad (característica cualitativa), mientras que la virulencia se refiere a la intensidad de la enfermedad causada por un patógeno (propiedad cuantitativa). La mayoría de los hongos patógenos son considerados muy virulentos comparados con otros organismos patógenos debido a que ellos tienen un período corto de incubación, producen abundante inoculo secundario, y pueden causar un rápido incremento en la incidencia de la enfermedad (Camargo, 2000). Se han documentado más de 1.500 especies de organismos entomopatógenos, de los cuales el 10 % de los generos son factibles de ser producidos masivamente y sólo el 1 % se comercializa (Pacheco, 2002).

#### **1.2.12 *Beauveria bassiana* (Bálsamo - Cribelo) Vuillemin 1912**

*Beauveria bassiana* es un hongo que pertenece al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Cordycipitaceae. Este hongo ha sido

encontrando atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de importancia agrícola (Alves, 1986). Los artrópodos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por micelio y conidios. Este hongo presenta una ontogenia holoblástica, la célula conidiógena es discreta, proliferante simpodial y rachiforme. El conidióforo es discreto, raras veces forman sinemas y los conidios son ameroconidio, hialinos, ovoides o globosos (Fig. 6).

Desde su descubrimiento, el género *Beauveria* ha demostrado poseer ciertas características que lo han posicionado como uno de los más utilizados en el control microbiano de artrópodos plaga. La principal ventaja de este género se atribuye a su distribución cosmopolita, su fácil reconocimiento y su frecuente aparición en la naturaleza; como así también a su extremadamente amplio espectro de hospedadores susceptibles y su amplia variabilidad en cuanto a virulencia (Vega y Blackwell, 2005).



**Fig. 6:** Estructura de fructificación de *B. bassiana*. Imagen de G. L. Barron.

De modo general, la germinación de los conidios de *B. bassiana* sobre insectos ocurre aproximadamente 12 horas después de la inoculación, el hongo penetra frecuentemente vía tegumento debido a una acción mecánica y a efectos enzimáticos, proceso que tarda aproximadamente unas 12 horas. Generalmente, 72 horas después de la inoculación, el artrópodo se halla totalmente colonizado por el hongo observándose importantes cantidades de conidióforos y conidios. La duración de las diferentes fases del ciclo depende de la especie de artrópodo involucrado y de las condiciones

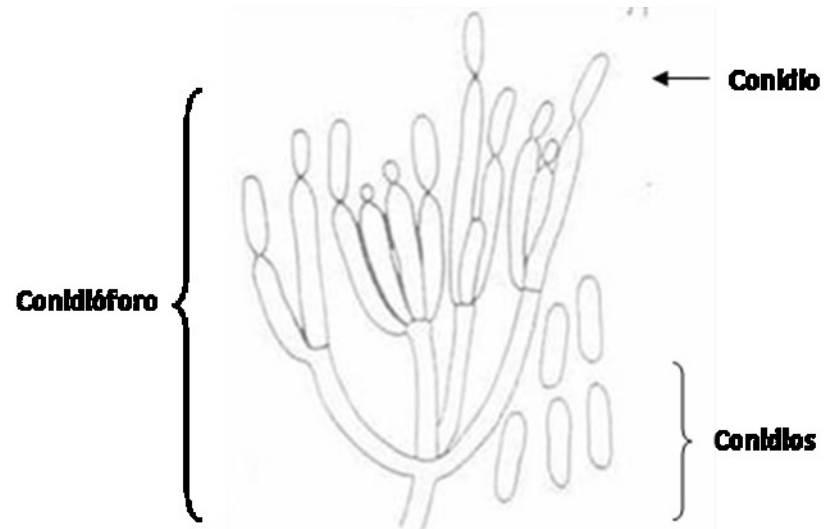


ambientales, siendo las más favorables: humedad relativa cercana al 90 % y una temperatura ambiente entre 23 y 28 °C (Alves, 1986).

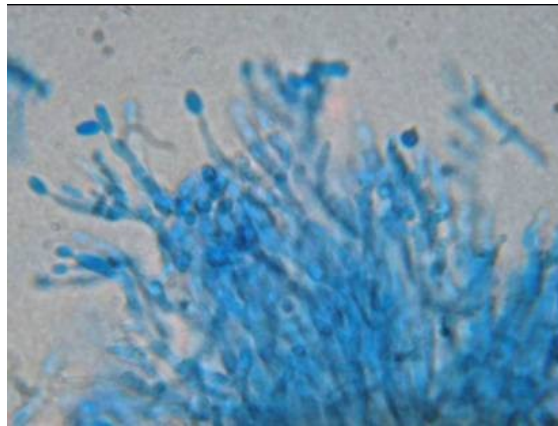
### ***1.2.13 Metarhizium anisopliae (Metschnikoff, 1879) Sorokin***

*Metarhizium anisopliae* pertenece al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae. Este patógeno ataca naturalmente diversos órdenes de insectos y ácaros (Alves, 1986; Yamamoto et al., 2002). La amplia gama de huéspedes del género *Metarhizium* lo hace comercialmente atractivo como un agente de control biológico (Miller et al., 2004). Los artrópodos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando esporula. Este hongo presenta una ontogenia enteroblástica fialídica, la célula conidiógena es una fialide. Los conidióforos son discretos, forman conidomas y los conidios son ameroconidios, cilíndricos, hialinos a verdosos, en cadenas basípetas que se unen formando columnas (Fig. 7 y 8).

*M. anisopliae* presenta dos patrones diferentes de desarrollo de acuerdo con las condiciones nutricionales: formación de apresorio en estadios tempranos y esporulación (formación de conidios) en estadios tardíos de infección en el hospedador. Han sido identificados siete genes relacionados con la esporulación de *M. anisopliae*, entre ellos el gen “cag7” que codifica una proteasa extracelular Pr1. Esta proteasa juega un importante rol en la degradación de las proteínas cuticulares de los insectos y es inducida durante los estadios finales de la patogénesis, cuando el hongo emerge del cuerpo muerto del artrópodo y subsecuentemente esporula sobre el cadáver (Small y Bidochka, 2005).



**Fig. 7:** Estructuras de fructificación de *M. anisopliae*.



**Fig. 8:** Estructuras de fructificación de *M. anisopliae* bajo microscopio óptico, teñidas con azul de algodón en lactofenol de Ammann 0,5 % p/v (400 X). Imagen Posadas y Lecuona, 2009

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.3.1 General

Evaluar la eficiencia de diversos aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* y *Metarhizium anisopliae* para el control microbiano de *Tibraca limbativentris*.

### 1.3.2 Específicos

1. Evaluar la presencia de hongos entomopatógenos sobre adultos de *T. limbativentris*, durante el periodo de post-cosecha del cultivo del arroz en la provincia de Corrientes.
2. Aislar hongos entomopatógenos de cadáveres de adultos de *T. limbativentris*.
3. Seleccionar aislamientos de hongos entomopatógenos nativos o de micoteca por su patogenicidad y virulencia sobre adultos de *T. limbatriventis*.
4. Determinar para la/s cepa/s fúngica/s seleccionada/s el Tiempo de Supervivencia Media (ST<sub>50</sub>) y la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) sobre adultos de *T. limbativentris* y su compatibilidad con diversos productos fitosanitarios usados frecuentemente en el cultivo del arroz.
5. Evaluar la producción masiva de conidios de la/s cepa/s seleccionada/s sobre diversos sustratos en fermentación en medio sólido (FMS) y desarrollar una formulación experimental del micoinsectida.
6. Evaluar la eficacia de los micoinsectidas que mejores resultados brinden sobre adultos de *T. limbativentris* bajo condiciones de invernáculo.

Para hacer frente a todos estos objetivos específicos, una serie de experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (LHE) del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) de INTA Castelar y en la Estación Experimental Agropecuaria de Corrientes (EEA Corrientes) - INTA.

### 1.3 HIPÓTESIS

**Hipótesis 1:** Es posible encontrar hongos entomopatógenos nativos asociados a la chinche del tallo *T. limbativentris* en la región arrocerá de la provincia de Corrientes.

**Hipótesis 2:** Algunos aislamientos de los hongos entomopatógenos nativos seleccionados pueden ser utilizados como bioinsecticidas para el control microbiano de *T. limbativentris*.

**Hipótesis 3:** Es posible utilizar a los aislamientos fúngicos seleccionados en mezclas con productos fitosanitarios de síntesis para aumentar la eficiencia de control de la plaga.

## CAPITULO 2

### Muestreo, Recolección y Aislamiento del Material Experimental

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

Las condiciones micro-meteorológica de alta humedad relativa, asociada a la elevada temperatura que ocurre en los campos de arroz bajo riego, presentan condiciones propicias para el desarrollo del insecto (Martins y Lima, 1994) así como de los hongos entomopatógenos (Carbonell et al., 1980). Se conoce la ocurrencia natural de enfermedades sobre los insectos de diferentes órdenes, siendo los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* los entomopatógenos más ampliamente utilizados en el manejo de insectos plagas de importancia en la agricultura (Lecuona, 1996)

Particularmente, *M. anisopliae* ha sido observado sobre Pentatomidos que atacan al arroz en Brasil, específicamente sobre la chinche del tallo (*T. limbativentris*) en condiciones naturales y durante el periodo de hibernación de este insecto (Rampelotti et al., 2007a). Sin embargo, en la República Argentina no se han reportado casos de infestaciones en chinches del arroz con hongos entomopatógenos, ni se han realizado aislamientos de cepas nativas sobre áreas infestadas con dicha plaga.

Según estudios realizados en Brasil, demuestran que esta plaga durante la época del periodo invernal permanece hibernando en los lotes de arroz no laboreados o preferentemente próximos a los mismos, en las partes más elevadas como taipas rondas o barrancas cubiertas por gramíneas, que normalmente circundan a los campos de arroz (Trujillo, 1991). Según algunos autores esta chinche del tallo se abriga, preferencialmente, en grupos de gramíneas, tales como cola de zorro (*Andropogon* spp.), capín, y otras presentes cerca de las chacras. La diapausa permite a los insectos la sobrevivencia durante períodos adversos que acontecen en la época invernal debido a factores ambientales como: fotoperiodo, temperatura y humedad (Tauber et al., 1986). El ingreso a los sitios de hibernación está regulado principalmente por un acortamiento en el fotoperiodo y un descenso de la temperatura. En consecuencia, existe poca información sobre los principales lugares de hibernación de este insecto en la zona arrocería en Corrientes, Argentina.

Los objetivos en esta etapa fueron:

- a) Obtención de adultos de *T. limbativentris* para iniciar su cría en la EEA – INTA Corrientes.

- b) Evaluar los sitios de hibernación de adultos de *T. limbativentris*, durante el periodo de post-cosecha del cultivo del arroz en la provincia de Corrientes.
- c) El aislamiento de hongos entomopatógenos nativos presentes en cadáveres de adultos de este pentatómido con la finalidad de disponer de microorganismos benéficos para futuros desarrollos y posibles usos dentro de estrategias de Manejo Integrado de Plagas.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Recolección de material experimental y determinación de zonas de hibernación

Los muestreos se llevaron a cabo durante el período invernal (finales de Julio-principios de Agosto 2011) en siete campos arroceros ubicados en las principales zonas productoras de la Provincia de Corrientes. Los campos establecidos para el muestreo fueron situados en las localidades de Mercedes, Paso de los Libres, Virasoro, 9 de Julio, El Sombrero, Itá Ibaté y Scorza Cué. Dentro de cada campo arrocero se recolectaron muestras en diferentes condiciones: lotes con rastrojo de arroz en pie, lotes laboreados, taipas rondas y campo natural aledaño a lotes arroceros (Fig. 9).



**Fig. 9:** Zonas de muestreo Invernal (Julio-Agosto 2011): **a)** Rastrojo de arroz en pie; **b)** Campo natural aledaño; **c)** Lote laboreado (1 rastra de disco); **d)** Taipa Ronda

Los muestreos fueron realizados manualmente, la unidad de muestreo es un marco de 0,25 m<sup>2</sup> (0,50 x 0,50 m) de área, donde se recolectan todos los insectos presentes. Para cada situación se tomaron 4 muestras de manera aleatoria (Tabla 3).

**Tabla 3:** Muestreo en la Provincia de Corrientes

Región arrocerá <sup>1</sup>	Zona Arrocerá <sup>1</sup>	Sitio de Muestreo	Arrocerá	Lugar de Muestreo	
Centro Sur	Centro Sur	Mercedes	Arroc. El Rocio	Rastrojo Arroz PIE	
				Lote Laboreado	
				Taipa Ronda	
	Malezales del Este	P. de los Libres	Arroc. Mirunga	Campo Natural	
				Rastrojo Arroz PIE	
				Taipa Ronda	
Noreste	Malezales del Este/ Bañados aguapey-cuay	Virasoro	Arroc. Storti	Campo Natural	
				Rastrojo Arroz PIE	
				Taipa Ronda	
Lomadas arenosas	Planicie arenosa	9 de Julio / Gdor. Martinez	Arroc. Sandoval	Campo Natural	
				Rastrojo Arroz PIE	
Norte	Terrazas del parana	Corrientes	EEA Corrientes	Lote Laboreado	
				Taipa Ronda	
				Campo Natural	
	Terrazas del parana	Ita Ibate	Arroc. Amanda	Arroc. Amanda	Rastrojo Arroz PIE
					Taipa Ronda
					Campo Natural
Terrazas del parana	Scorza Cue	Arroc. Vañek	Arroc. Vañek	Rastrojo Arroz PIE	
				Taipa Ronda	
				Campo Natural	

<sup>1</sup>Región y Zona arrocerá según la clasificación realizada por Ligier, (2008).

En primer lugar se registraron algunas características del sitio de muestreo (presencia/ausencia de agua en el lote, de vegetación y/o rastrojo de arroz); luego se determinó la composición botánica (CB) y la frecuencia relativa de las especies presentes en el tapiz (FR) mediante el reconocimiento de especies y el uso de un software denominado Botanal Sombrerito (Casco et al., 2001). Esta herramienta es utilizada para monitoreo de todos los recursos forrajeros, destinados tanto a la generación como transferencia de tecnologías. Para la CB se utilizó el método de los rangos y se estimó el aporte en porcentaje. El FR registra el número de veces que aparece una especie en el total de las observaciones realizadas, incluyendo además todos los individuos presentes.

Posteriormente, se procedió a la búsqueda de *T. limbativentris*, para ello fue necesario cortar al ras del suelo toda materia vegetal, volcarla sobre una lona y registrar todo lo que se encontraba dentro del marco de muestreo.

Todos aquellos insectos que se hallaron muertos fueron separados individualmente e identificados y llevados al laboratorio para evaluar la presencia de hongos entomopatógenos (ver punto 2.2.3).

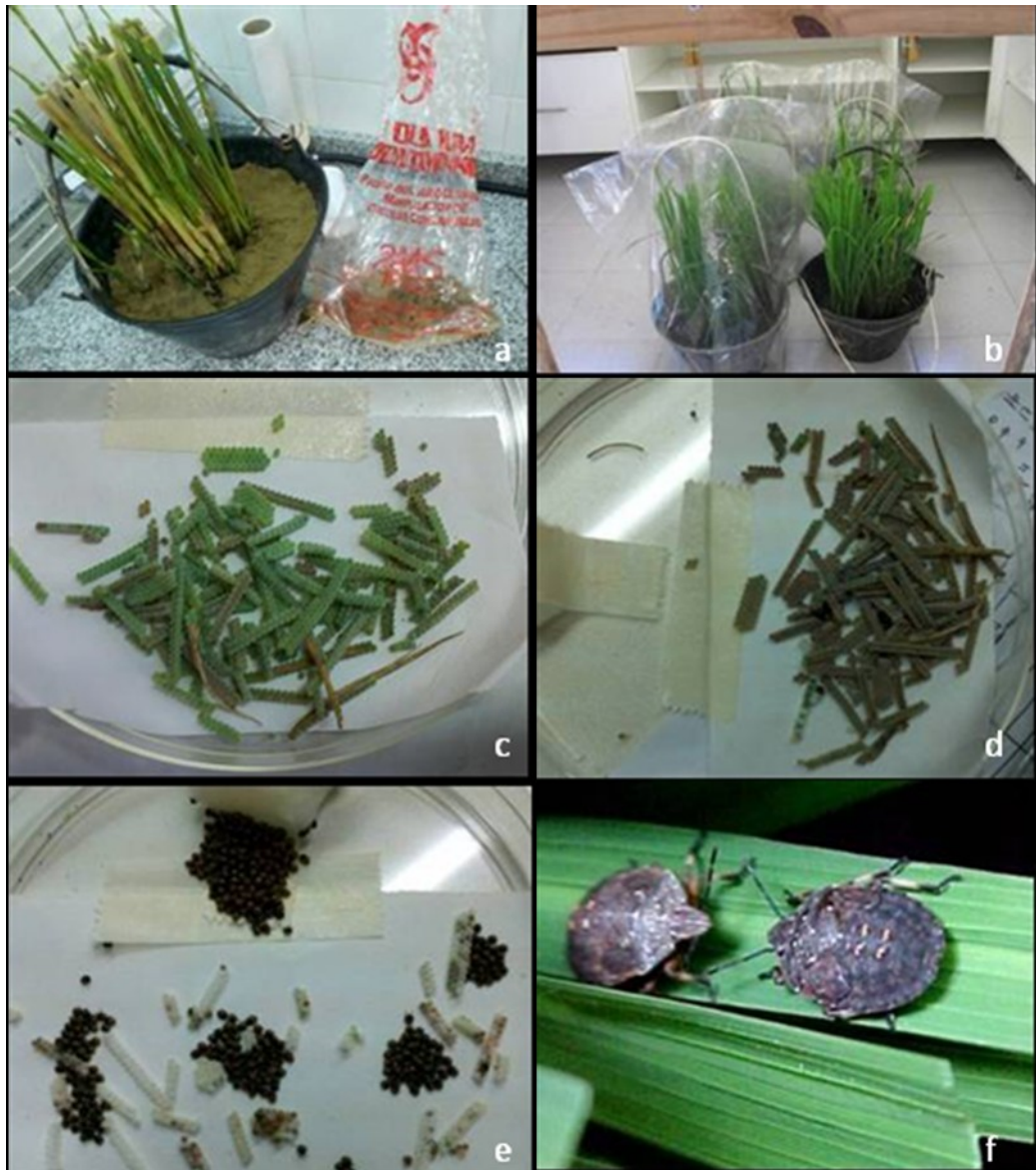


### **2.2.2 Cría y mantenimiento de chinches en laboratorio**

Los adultos vivos de *T. limbativentris* recolectados en el muestreo anterior fueron llevados a un invernáculo en donde fueron criados sobre plantas de arroz (variedad “Fortuna INTA”), sembradas en baldes de 9 litros, sobre condiciones ambientales del invernáculo. Posteriormente, huevos y ninfas de 1° y 2° estadio fueron llevados a una sala de incubación en laboratorio. El suministro de plantas de arroz durante las diferentes épocas del experimento fue realizado haciéndose siembras cada 20 días.

En laboratorio, las ninfas fueron criadas hasta la fase adulta en baldes de 7 litros conteniendo suelo estéril, más una capa de arena esterilizada de 1 cm de espesor, saturados con agua destilada estéril. El suelo mantiene la humedad de la arena y evita la desecación de huevos y ninfas. En este sistema se sembró arroz (30 semillas de la variedad Fortuna INTA por balde) que servirían de fuente de alimento y substrato para la oviposición. Estos baldes fueron cubiertos por un tela tipo muselina, para permitir un buen intercambio gaseoso y evitar que las mismas se escapen. Una vez llegado al 3-4° estadio ninfal se cambió esta tela por una malla de polietileno transparente, que permite una mayor entrada de luz al interior de la misma. Los insectos fueron mantenidos en una cámara de cría en condiciones controladas, a una temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , alrededor de un 85 % de humedad relativa y con un fotoperiodo de 14 hs de luz/10 hs oscuridad. Cada 15 días se pasaron los insectos a nuevos baldes y se separaron los huevos puestos y ninfas de 1° y 2° estadio a nuevos baldes (Fig. 10).

Se realizaron observaciones como el número de huevos por postura, duración del estado de huevo, número de ninfas eclosionadas y duración del 1° y 2° estadio ninfal.



**Fig. 10:** Cría de *T. limbativentris*: **a)** Preparación macetas con arroz; **b)** Sala de cría acondicionada; **c)** Huevos recién puestos; **d)** Huevos de una semana postura; **e)** Ninfas eclosionados; **f)** Ninfas de 5° estadio obtenidos a partir de la cría.

### 2.2.3 Aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de adultos de *T. limbativentris*

Los cadáveres de insectos adultos muestreados de lotes arroceros y de campos próximos a los mismos, fueron llevados al laboratorio para su procesamiento:

#### **a) Desinfección**

Las chinches fueron pasadas por alcohol etílico al 70 % durante 1 minuto, luego por hipoclorito de sodio al 1 % por alrededor de 1 minuto y finalmente por agua destilada estéril entre 1 a 2 minutos.

**b) Incubación**

Los insectos desinfectados se colocaron en una cámara húmeda y fueron incubados a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  durante una semana en oscuridad.

**c) Conservación**

Una vez pasado el tiempo de incubación, las cajas de Petri se colocaron en heladera sin el algodón y fueron selladas para mantener la colonia de hongos en desarrollo, hasta el momento de ser aislados en laboratorio.

**d) Aislamiento**

De los cadáveres con presencia de hongos se procedió a su extracción, para lo cual se usaron diversos medios de cultivos. Para *B. bassiana* se utilizó Medio Completo (MC) compuesto de (gr/l):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,4;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 0,6; KCl, 1;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,7; Glucosa, 10; Agar, 15; Extracto de levadura, 5; Cloranfenicol, 0,5 gr/l), para *P. lilacinus* y *M. anisopliae* se utilizó Papa Dextrosa Agar (PDA (Merk®)) a razón de 39 gr/l más antibiótico (Cloranfenicol, 0,5 gr/l), y para aquellos hongos dudosos se usó un medio en base a avena (OA-CTAB más cloranfenicol) (Posadas et al., 2012). Posteriormente fueron llevados a incubación a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por aproximadamente una semana. Después del crecimiento y esporulación las cepas aisladas fueron identificadas y almacenadas a  $10^\circ\text{C}$ .

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSION

### 2.3.1 Recolección de material experimental y determinación de zonas de hibernación

Fueron colectados 293 adultos hibernantes de *T. limbativentris* durante la época post-cosecha del cultivo del arroz, de los cuales el 82,93 % (245 adultos) se encontraban vivos. Estos insectos permitieron iniciar la cría en condiciones de laboratorio en la EEA – INTA Corrientes.

Durante el muestreo no se observó la presencia de los estados ninfales y de huevo de esta plaga. Los adultos se encontraron cubiertos por abundante rastrojo, en grietas del suelo, y/o debajo de las malezas presentes. En la Tabla 4 se muestra un resumen con el número de chinches por zonas y sitios de muestreo.

**Tabla 4:** Número de adultos hibernantes de *T. limbativentris* colectados durante la época de post-cosecha (Julio-Agosto) en campos arroceros

Sitio de muestreo	Lugar de muestreo	Número adultos hibernantes de <i>T. limbativentris</i>		
		Vivos	Muertos	
			Sin hongos	Con hongos
9 de Julio	Lote arroz_pie	6	0	0
	Campo Natural	1	0	0
Corrientes	Lote arroz_laboreado	5	3	1
	Lote arroz_pie	27	10	3
	Taipa ronda	7	0	0
	Campo Natural	2	0	0
Ita ibate	Lote arroz_pie	6	0	0
	Taipa ronda	4	1	0
	Campo Natural	1	0	0
Mercedes	Lote arroz_laboreado	0	0	0
	Lote arroz_pie	20	6	3
	Taipa ronda	7	3	0
	Campo Natural	26	1	3
Paso de los libres	Lote arroz_pie	32	6	0
	Taipa ronda	76	4	1
	Campo Natural	0	0	0
Scorza cue	Lote arroz_pie	0	0	0
	Taipa ronda	8	1	1
	Campo Natural	15	1	0
Virasoro	Lote arroz_pie	1	0	0
	Taipa ronda	1	0	0
<b>Total</b>		245	36	12

En la Tabla 4 se puede observar que en todos los muestreos el 39,20 % de la población hibernante de adultos de *T. limbativentris* se registró en los lotes de arroz en

pie (LAP) bajo el rastrojo de arroz y ubicado principalmente en las curvas de nivel (taipas). En los muestreos realizados en los LAP en la localidad de Scorza Cué no se observó presencia de chinches adultas debido a que el lote se encontraba en condiciones totalmente anegadas. En las localidades de Virasoro y 9 de Julio, ambos campos presentaban condiciones de anegamiento parcial, y el número de chinches adultas halladas fue mucho menor en los LAP. El 30,85 % de los insectos encontrados fueron colectados en TR, debajo de la vegetación existente en la misma. El 25,58 % se halló en el campo natural aledaño a los lotes de arroz (CN), y sólo el 4,38 % de las chinches colectadas provienen de los lotes de arroz laboreados (LAL). Esta última situación sólo se logró evaluar en dos sitios, debido a la ausencia de preparación de los lotes a la fecha de muestreo.

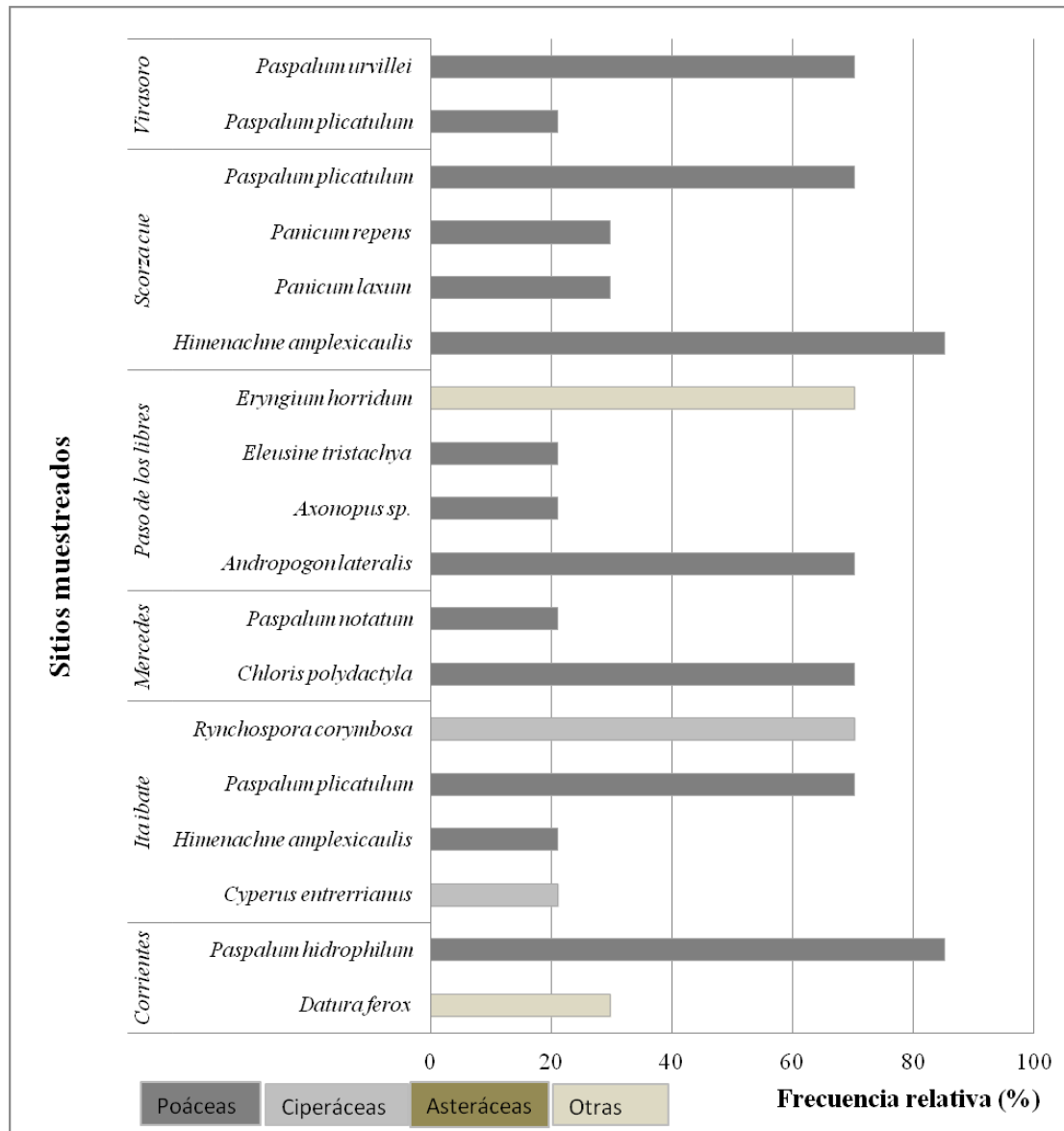
Ferreira et al., (1997) exponen que luego de la cosecha del arroz (Marzo-Abril), *T. limbativentris* se refugia principalmente en el rastrojo del cultivo. Cuando el rastrojo se seca, se humedece demasiado o se destruye, las chinches se dispersan, y buscan nuevos refugios próximos al lote. La dispersión de esta plaga ocurre principalmente por vuelos cortos o caminando sobre el suelo. Cuando no encuentran en las proximidades de los lotes las especies vegetales que son de su preferencia, las chinches emprenden vuelos más largos. Generalmente prefieren poáceas y ciperáceas características de suelos húmedos. Según Trujillo, (1970) en caso de recorrer cortas distancias, se refugian bajo restos de plantas en las que existe humedad y también en grietas abiertas del suelo. Todo esto con el objetivo de pasar el período sin cultivo (otoño/invierno) en hibernación (Pazini et al., 2011).

El refugio más cercano al lote son las TR, que por lo general están provistas de una cobertura vegetal natural, cuya composición está muy influenciada por el CN. En el muestreo realizado en las TR se observó que los adultos tienen una preferencia hacia las matas de pasto de la familia Poaceae, ubicándose entre los macollos, muy próximos al cuello de la planta.

En la Fig. 11 se observan las especies vegetales más frecuentes en las TR donde se realizó el muestreo de adultos hibernantes de *T. limbativentris*. La mayoría de las especies presentes pertenecen a la familia Poaceae (*Paspalum hidrophilum*, *P. plicatulum*, *P. notatum*, *P. urvillei*, *Himenachne amplexicaulis*, *Chloris polydactyla*, *Andropogon lateralis*, *Axonopus* sp., *Eleusine tristachya*, *Panicum laxum* y *P. repens*) y a la familia Ciperaceae (*Cyperus entrerrianus* y *Rynchospora corymbosa*).

Según Trujillo (1970), entre los hospederos más importantes para esta chinche en Corrientes se encuentran *Andropogon* spp. y *Paspalum* spp., este último presente en casi todos los sitios de muestreo. Según Mielitz et al., (1993) una de las características de estos grupos de vegetación es que presentan una menor amplitud de variación de temperatura y humedad relativa, en relación con la vegetación circundante. Link (1997), menciona a las poáceas *Andropogon* sp., *Eryngium* sp. y *P. urvillei* como hospederos de *T. limbiventris* en Sao Sepe-RS-Brasil, observándose que estos grupos abrigan mayor número de ejemplares. La especie *Eryngium horridum*, perteneciente a la familia de las Apiaceae fue, junto a *A. lateralis* (Poaceae), la de mayor frecuencia en las TR de Paso de los Libres, en donde se muestreo el mayor número de chinches adultas de *T. limbiventris*.

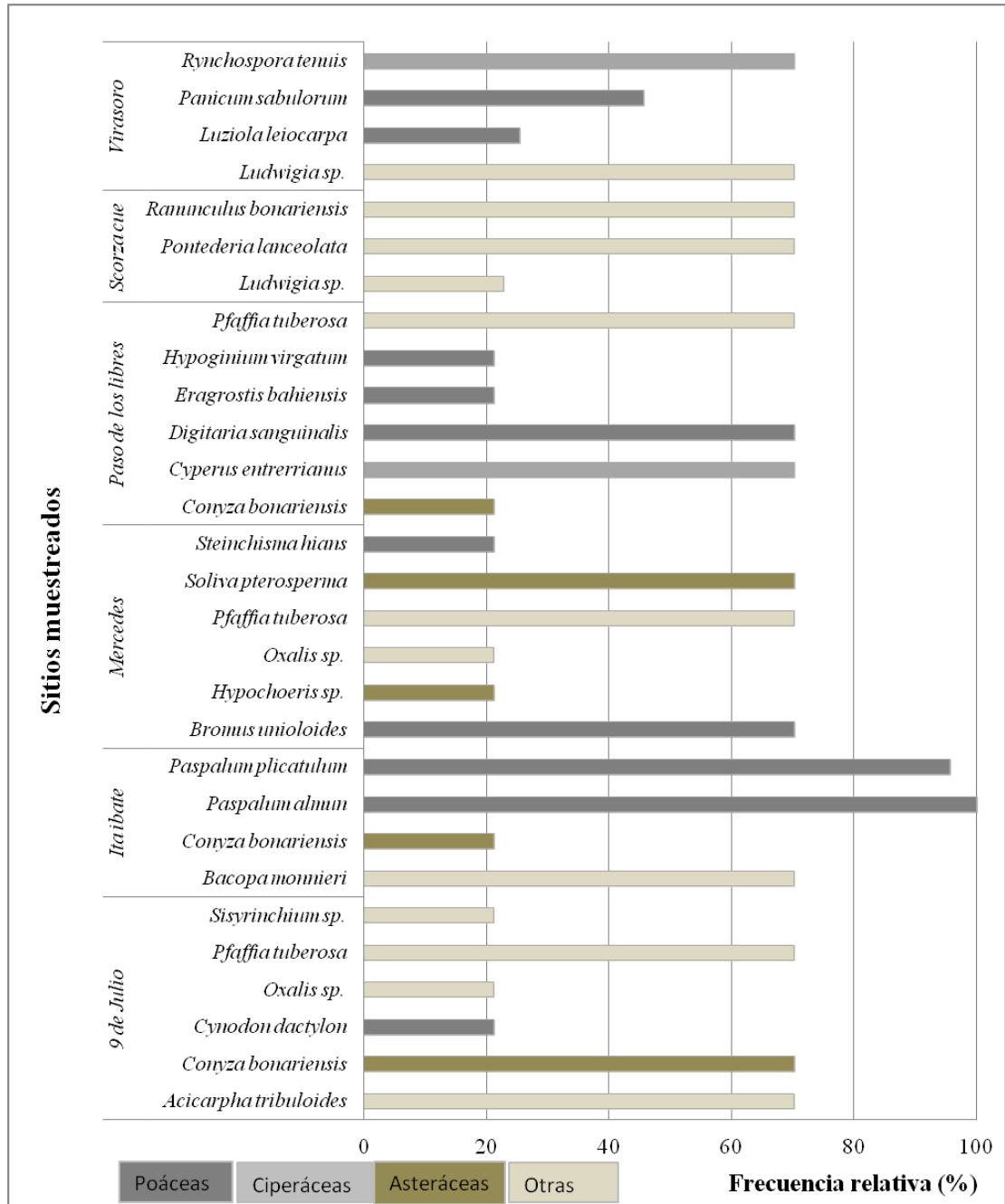
En las muestras de TR de Scorza Cué las especies vegetales de mayor frecuencia son *P. plicatum* e *H. amplexicaulis* (ambas poáceas) sobre esta última se observó la mayor proporción de adultos de *T. limbiventris*, especie no citada en la bibliografía con anterioridad. Las especies vegetales que caracterizaron las muestras de Virasoro son dos poáceas: *P. plicatum* y *P. urvillei*. En las muestras pertenecientes a Mercedes dos poáceas presentaron la mayor frecuencia *P. notatum* y *C. polydactyla*. En Corrientes, la TR se caracterizó principalmente por la mayor frecuencia de *P. hidrophilum*.



**Fig. 11:** Especies vegetales presentes de mayor frecuencia en las taipa ronda (TR) al momento de los muestreos invernales de chinches adultas de *T. limbativentris*

Al muestrear los LAP, se encuentra una diversidad de especies vegetales que buscan colonizar los lotes post-cosecha del cultivo del arroz (Fig. 12). En estos LAP los adultos de *T. limbativentris* no se encontraban bajo o dentro de la vegetación, sino que estaban ubicados debajo del abundante rastrojo del cultivo, principalmente sobre las taipas o donde por motivos de la cosecha el rastrojo queda acumulado. Los LAP, presentan con mayor frecuencia individuos de la familia Poaceae (*Cynodon dactylon*, *Paspalum almun*, *P. plicatulum*, *Bromus unioloides*, *Steinchisma hians*, *Digitaria sanguinalis*, *Eragrostis bahiensis*, *Hypogonium virgatum*, *Luziola leiocarpa*, *Panicum sabulorum*), Ciperaceae (*C. entrerrianus* y *Rynchospora tenuis*), Asteraceae (*Hypochoeris* sp., *Soliva pterosperma* y *Conyza bonariensis*) entre otras (ej. *Pfaffia*

*tuberosa* que pertenece a la familia de las Amaranthaceae). En los LAP de Corrientes, no hubo presencia de vegetación, debido al efecto de una aplicación de un herbicida total al momento de post-cosecha.

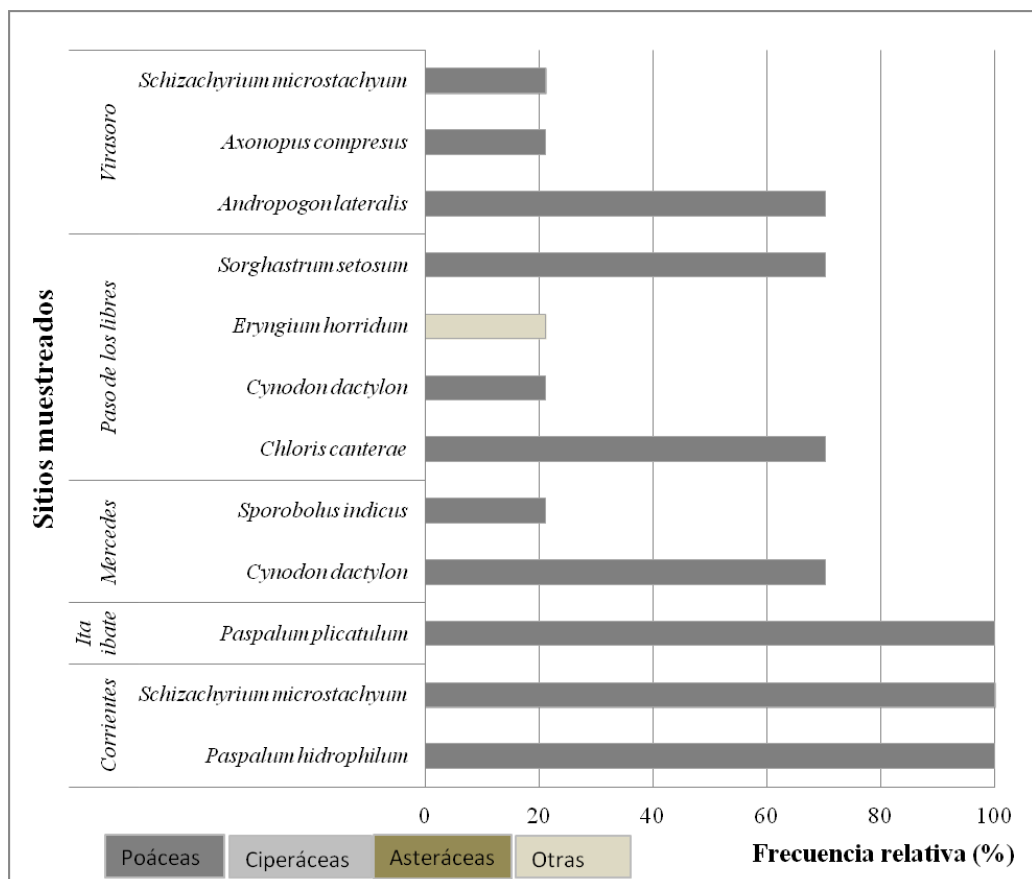


**Fig. 12:** Especies vegetales presentes de mayor frecuencia en los lotes de arroz pie (LAP) al momento de los muestreos invernales de chinches adultas de *T. limbativentris*

En los lotes de LAL, no hubo presencia de vegetación, debido a que fue enterrado por el laboreo del mismo.



Al muestrear el CN, se observa que la mayor frecuencia relativa de especies vegetales pertenecen a la familia Poaceae, en donde se encontraba ubicado el 25,58 % de las chinches de *T. limbiventris* que fueron recolectados (Fig. 13). La zona de Virasoro se caracterizó por la presencia y abundancia de *A. lateralis*. Itá Ibaté, estuvo caracterizado por una mayor frecuencia de la especie *P. plicatum*, mientras las otras especies presentes no superaban el 20 % de frecuencia relativa. En Corrientes las muestras estuvieron compuestas en su gran mayoría por la presencia de dos especies, *Schizachyrium microstachyum* y *P. hidrophilum*. En Mercedes, *Sporobolus indicus* y *C. dactylon* fueron las especies de mayor frecuencia. En cambio, en Paso de los Libres, *Chloris canterae* y *Sorghastrum setosum*, tuvieron mayor presencia y abundancia con respecto a las demás especies. En la zona de 9 de Julio, no se pudo muestrear la condición de CN, debido a impedimentos climáticos y en Scorza Cué se encontró solamente vegetación seca en el CN y en la misma no se halló presencia de chinches adultas de *T. limbiventris*.



**Fig. 13:** Especies vegetales presentes de mayor frecuencia en los Campos Naturales aledaños (CN) al momento de los muestreos invernales de chinches adultas de *T. limbiventris*

Estas especies agrupadas mencionadas anteriormente se caracterizan por formar matas densas, que tienen una menor amplitud de variación de la temperatura y humedad relativa, en relación a la vegetación circundante (Ferreira et al., 1997). En todos los sitios muestreados, que están caracterizados por estas especies se hallaron adultos de *T. limbativentris*. Mielitz, (1993) constató a *T. limbativentris* en grupos de la poácea *S. microstachyum*, adyacentes a áreas de arroz en el Eldorado en Rio Grande do Sul-Brasil. Por otro lado, Aner y Becker (1993), estudiaron la ecología de pentatómidos, considerando los grupos de *S. microstachyum* y *Andropogon bicornis* de la región arroceras de Eldorado de Sul-RS-Brasil, verificándose que el estado fisiológico de *T. limbativentris* estaba en diapausa imaginal reproductiva y era la especie más importante en abundancia y dominancia.

El 63,64 % de los insectos colectados provinieron de los muestreos de Paso de los Libres y de Mercedes, pertenecientes a la región arroceras del Centro Sur, caracterizada por lomas de 1 a 3 % de pendiente en general (Ligier, 2008), lo que a nivel de arroceras presenta un mayor número de taipas por lotes, condición que favorece a la presencia de esta plaga. El 28,29 % de las chinches provenía de la región Norte (Corrientes, Scorza Cué e Itá Ibaté) y el restante 8,08 % provenía de Virasoro y de 9 de Julio.

Los resultados obtenidos demuestran que los lugares preferidos para la hibernación son los situados próximos y dentro de los lotes, en las partes más elevadas, sin anegamiento pero en condiciones húmedas, y con presencia de abundante rastrojo o vegetación que le brinde protección. Como principales sitios hibernantes fueron identificados las poáceas *A. lateralis*, *P. urvillei* e *H. amplexicauli*, y la Apiaceae *E. horridum* (Fig. 14). De acuerdo con Oliveira et al., (2005) si estas plantas no están presentes, la chinche busca otras especies que forman grupos con masa foliar densa como por ejemplo *Eringium eburneum* y *Erianthus* sp. Según Prando, (2003) cuanto más denso sea el grupo o la arquitectura de las plantas, mayor será la preferencia de la chinche por esas especies. Los sitios menos preferidos son aquellos cubiertos por una vegetación rala o arbustiva.

*T. limbativentris* es una plaga muy específica del cultivo del arroz, ya que prefiere a la misma sobre cualquier otra especie. Una de las estrategias conocidas que presenta resultados satisfactorios en reducir la infestación es la eliminación de los restos de cosecha en aquellas áreas que fueron infestadas anteriormente por esta plaga. Sin embargo, el cultivo del arroz, está cada vez más volcado hacia una agricultura de

siembra directa, en la cual, la remoción del suelo es mínima, es decir, sólo se remueve las curvas de nivel. Esto puede llevar a un aumento en la población inicial de esta plaga en los lotes arroceros que podría influir en los rendimientos, y en las aplicaciones necesarias al inicio del cultivo.



**Fig. 14:** Especies vegetales bajo las cuales se encontraron adultos de *T. limbativentris* en los muestreos invernales

### 2.3.2 Cría y mantenimiento de chinches en laboratorio

Con los adultos de *T. limbativentris* obtenidos del muestreo invernal que fueron alimentados sobre arroz variedad Fortuna INTA en condiciones de invernáculo se logró que las chinches copulen y coloquen huevos sobre estas plantas. Las oviposiciones fueron retiradas y colocadas nuevamente sobre plantas de arroz cubiertas con una malla de tul, en condiciones de laboratorio. Se probaron diversas dietas caseras y en distintas proporciones (azúcar más agua, miel con agua, otras poáceas: *A. lateralis*, *C. polydactyla*, *P. urvillei* y *P. plicatum*) y no se logró criarlos con otro sistema que no sea sobre plantas de arroz. Probablemente esto se deba a que no es una especie polífaga, y cuando utiliza como fuente de alimento plantas no preferenciales, los mismos se ven

afectados. También su hábito alimentario puede tener influencia, ya que las mismas se alimentan de los tallos posicionados cabeza abajo.

De las oviposiciones de *T. limbativentris* que fueron separadas y puestas en cajas de Petri con un papel de filtro humedecido nacieron cerca del 100 % de las ninfas y se logró que las ninfas de 1° estadio pasen al 2° estadio sin ningún inconveniente (Tabla 5), siendo los valores de mortalidad en estado de huevo y de ninfa de 1° estadio muy bajas, 1,92 % y 3,62 % respectivamente. La duración del período embrionario de *T. limbativentris* fue de  $5,92 \pm 1,2$  días. Resultados semejantes fueron obtenidos por Silva et al., (2004) y Prando et al., (1993) quienes observaron una duración de 6,9 y 7,5 días, respectivamente. El 1° período ninfal fue de  $6,82 \pm 2,51$  días, durante este estadio las ninfas permanecen inmóviles y no se alimentan hasta pasar a su 2° estadio. Valores similares fueron observados por Silva et al., (2004), de  $6,5 \pm 1,66$  días.

Los demás parámetros biológicos no fueron tenidos en cuenta, debido a que el objetivo era lograr la permanencia de los primeros estadios ninfales para luego colocarlas sobre plantas de arroz, y de allí, obtener los adultos de *T. limbativentris* para ser utilizarlos en los ensayos posteriores.

**Tabla 5:** Valores de parámetros biológicos obtenidos para *Tibraca limbativentris* (Stal., 1980) durante su cría sobre plantas de arroz variedad Fortuna INTA

Parámetros medidos en la cría	Media	D.E.
N° huevos/ postura	26,65	11,84
N° Ninfas 1° estadio	26,06	11,5
N° Ninfas 2° estadio	24,88	10,59
Mortalidad Huevo a Ninfa 1° (%)	1,96	3,24
Mortalidad Ninfa 1° a Ninfa 2° (%)	3,62	5,62
Mortalidad Huevo a Ninfa 2° (%)	5,55	5,74
Duración H-N 1° (días)	5,94	1,2
Duración N 1° - N 2° (días)	6,82	2,51
Duración H-N 2° (días)	12,76	1,89

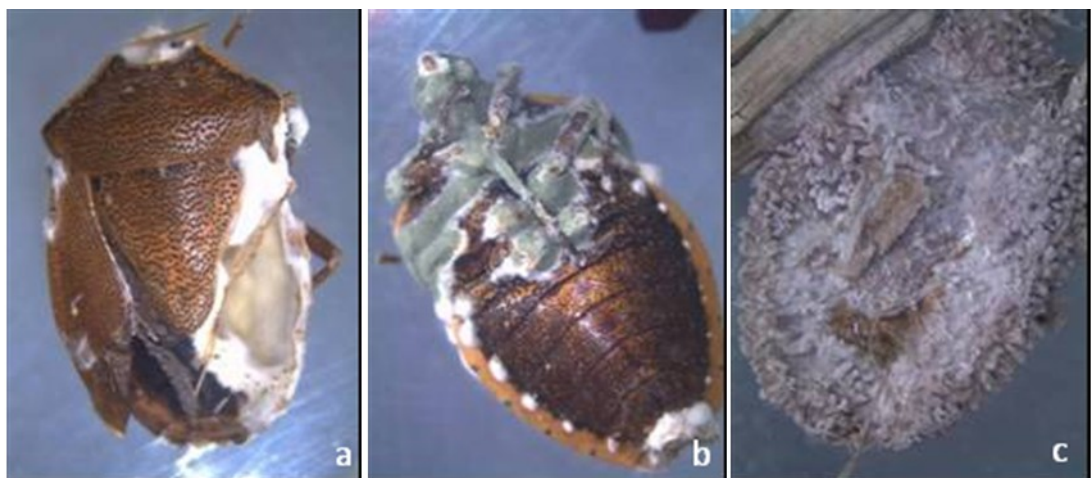
### 2.3.3 Aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de adultos de *T. limbativentris*

Se colectaron un total de 293 chinches, de ellas 245 se hallaban vivas y fueron destinadas a la cría, mientras que 45 chinches se hallaban muertas y fueron separados en sobres, identificados y llevados a laboratorio para su posterior incubación. Las chinches incubadas mostraron presencia de diversos hongos en su superficie, lográndose aislar 11 cepas de hongos entomopatógenos que fueron incorporados a la Micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del IMYZA (Tabla 6), 3 de *Beauveria*

*bassiana* (Cepas Bb 362, Bb 363 y Bb 364) todas provenientes de la EEA Corrientes – INTA; 5 de *Metarhizium anisopliae* (Cepas Ma 72 y Ma 74 provenientes de Itá Ibaté, Ma 73 aislado de campos de Mercedes, y la Ma 75 y Ma 76 provenientes de lotes arroceros de la EEA Corrientes - INTA) y 3 correspondientes a *Paecilomyces lilacinus* (Cepas Pl 35, Pl 36 halladas en Itá Ibaté y Pl 33 en Mercedes) (Fig. 15). Según Tigano-Milani et al., (1993), el hongo *M. anisopliae* fue detectado apenas en un 6 % de 81 muestras de suelo oriundas de diferentes municipios Brasileiros, por lo que su ocurrencia en suelo es baja. Por otro lado, Rampelotti et al., (2007a) observaron la ocurrencia natural del hongo *M. anisopliae*, sobre la chinche del tallo durante el período de hibernación de este insecto.

**Tabla 6:** Cepas de *Beauveria bassiana* (Bb), *Paecilomyces lilacinus* (Pl) y *Metarhizium anisopliae* (Ma), recolectados en campos arroceros

Cepa	Procedencia	Fecha
Bb 362	El Sombrero/Ctes/Arg.	17/10/2011
Bb 363	El Sombrero/Ctes/Arg.	07/02/2012
Bb 364	El Sombrero/Ctes/Arg.	27/07/2011
Pl 35	Ita Ibate/Ctes/Arg.	29/07/2011
Pl 36	Ita Ibate/Ctes/Arg.	29/07/2011
Pl 33	Mercedes/Ctes/Arg.	27/07/2011
Ma 72	Ita Ibate/Ctes/Arg.	29/07/2011
Ma 73	Mercedes/Ctes/Arg.	27/07/2011
Ma 74	Ita Ibate/Ctes/Arg.	29/07/2011
Ma 75	El Sombrero/Ctes/Arg.	03/04/2012
Ma 76	El Sombrero/Ctes/Arg.	03/04/2012



**Fig. 15:** Cadáveres de chinches adultas de *T. limbativentris* halladas en los muestreos: **a)** Muerta por *Beauveria bassiana* (Bb), **b)** Muerta por *Metarhizium anisopliae* (Ma) y **c)** Muerta por *Paecilomyces lilacinus* (Pl)

## CAPITULO 3

### Bioensayos para seleccionar la cepa promisoras para el control de *Tibraca limbativentris*.

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Entre los patógenos evaluados como una alternativa al control químico de las chinches, los hongos entomopatógenos han sido los más promisorios (Roessler, 1989; Parella y Lewis, 1997; Samish y Rehacek, 1999; Chandler et al., 2000) dado que presentan una amplia distribución y un gran espectro de hospedadores; además la principal vía de infección se produce por penetración del hongo a través de la cutícula del huésped, sin necesidad de que se produzca ingestión del propágulo, como en el caso de las bacterias, los virus y los protozoarios.

El uso de hongos entomopatógenos es mundialmente conocido y, entre estos, los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* son utilizados como agentes biocontroladores de plagas agrícolas de varias especies de diversos órdenes (Alves et al., 2008), inclusive Hemiptera (Butt et al., 1994; Loureiro y Moino Jr., 2006). Investigaciones pioneras realizadas en Asia, evaluaron el efecto de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre el pentatomido *Scotinophara coarctata* (F.) que atacan al tallo del arroz (Rombach et al., 1986). Martins y Lima, (1994) sugieren que el hábito de localización del insecto y de las condiciones micro meteorológicas entre los tallos de arroz serían adecuadas para el establecimiento y diseminación de los hongos entomopatógenos en los arrozales. Estos autores demostraron la eficiencia de una cepa de *M. anisopliae* en el control de la chinche del tallo. Posteriormente, otras cepas de *M. anisopliae* y de *B. bassiana* fueron evaluadas en cuanto a su virulencia para *T. limbativentris* en condiciones de laboratorio (Martins et al., 1997), demostrando una mayor eficiencia de *M. anisopliae* para el control de esta plaga.

Existe una alta diversidad genética dentro de las cepas de una misma especie de hongo. Por lo tanto, es necesario seleccionar cepas para el control de una determinada especie de insecto a través del muestreo de incidencias naturales y posteriores bioensayos para determinar la virulencia de las cepas sobre el insecto plaga (Santos et al., 2002; Loureiro et al., 2005).

En la actualidad, las investigaciones sobre el tema reflejan la tendencia general al desarrollo de micoinsecticidas, es decir, productos formulados con hongos entomopatógenos destinados a su utilización como insumos en la producción agrícola, para la sanidad animal o en la prevención de enfermedades humanas. Por ello, es necesario conocer la compatibilidad del patógeno con otras prácticas agrícolas para evitar pérdidas de eficiencia de control y facilitar la selección de estos productos (Hirose et al., 2001; Neves et al., 2001a). El uso de productos fitosanitarios incompatibles puede inhibir el desarrollo y la reproducción de estos patógenos, afectando el control de plagas (Jaronski, 2010). Según Alves et al., (1998b) se pueden presentar diversos efectos de los productos fitosanitarios sobre los hongos entomopatógenos, ya sean deletéreos, nulos o sinérgicos. Estos efectos pueden variar dependiendo de la especie, la cepa patógena, el principio activo y la dosis usada (Purwar y Sachan, 2006). Batista Filho et al., (2001) relatan la importancia de la interacción entre insecticidas químicos y hongos entomopatógenos. Según estos autores, el control del insecto plaga podría ser aún más eficiente si existiese compatibilidad entre el insecticida y la cepa fúngica, ya que el fitosanitario desempeña su capacidad estresante facilitando la acción rápida y fácil de los hongos entomopatógenos. En algunos casos, productos fitosanitarios compatibles podrían ser utilizados en conjunto con hongos entomopatógenos a modo de incrementar su eficiencia (Moino y Alves, 1998). El conocimiento de la interacción entre los hongos entomopatógenos y los productos fitosanitarios puede facilitar la elección de los productos a usar en programas de MIP.

Al menos 12 especies de hongos han sido utilizadas como ingredientes activos en micoinsecticidas. Durante las últimas 4 décadas, alrededor de 80 empresas en el mundo han desarrollado un total de 171 micoinsecticidas y micoacaricidas. Los países que producen mayor cantidad de micoinsecticidas son en primer lugar Brasil contando con 35 productos en el mercado formulados con *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Boveril, Metarril, Metarriol, entre otros) para el control de diferentes artrópodos plaga seguido por Estados Unidos y México con 22 y 18 productos respectivamente (Mycar, Botani Gard, Laginex, Pae-Sin, Meta-Sin, etc). Colombia, Costa Rica y Cuba también cuentan con algunos de estos productos en el mercado. Los productos desarrollados en América del Sur representan el 42,7 %, mientras que los de América del Norte solo representan el 20,5 % del total; en orden decreciente le sigue América Central con un 7 % y finalmente África y Oceanía con un 2,9 % y 2,3 % respectivamente (Faria y Wraight, 2007). En nuestro país, existe un producto a base de *B. bassiana* para el control de

vinchuca (*Triatoma infestans* – Hemiptera: Reduviidae) que está en trámite de registro en la ANMAT, y otro en proceso de registro en SENASA para el control del psílido de la yerba mate, ambos fueron realizados conjuntamente por la empresa Laboratorios Biagro S.A. y el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA, INTA, Castelar).

Para utilizar hongos entomopatógenos como bioinsecticidas deben producirse cantidades masivas del mismo, que permita una buena relación costo - rendimiento en la producción, manteniendo su capacidad infectiva por un período de tiempo considerable. Actualmente, la mayor producción de los hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva en un sustrato natural. Siendo el arroz el más utilizado, debido a su bajo costo (Leite et al., 2003). Estos sustratos proporcionan todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y reproducción de los hongos (Alves et al., 2008).

La producción de hongos sobre medios sólidos, por no requerir tecnologías mejoradas como las exigidas en la fermentación líquida, es la forma utilizada con mayor frecuencia. Este método permite la producción directa de unidades infectivas y debido a su simplicidad de producción es usado en varios países para la producción artesanal y semi-industrial de hongos entomopatógenos (Alves et al., 1998a). Se considera que esta técnica es la forma de producción más adecuada para los hongos que producen conidios aéreos como *M. anisopliae* y *B. bassiana*, ya que en función de sus necesidades nutricionales y metabólicas, estos entomopatógenos se adaptan mejor a estos procesos (Moino Jr., 2000). Asimismo, los conidios pueden ser separados fácilmente del sustrato y, generalmente, presentan buena virulencia para las plagas objetivos (Alves et al., 2008).

La formulación es la etapa fundamental en el desarrollo de un bioinsecticida, ya que la misma asegura que el ingrediente activo junto con otros materiales forme un producto estable, seguro, efectivo y fácil de aplicar (Batista Filho et al., 1998). Una formulación óptima debe asegurar la estabilidad biológica y física del producto en condiciones de almacenamiento y debe optimizar la viabilidad y actividad biocontroladora del principio activo (Ramle et al., 2004). En toda formulación se distinguen dos tipos de componentes: el principio activo responsable de la actividad biocontroladora y los excipientes que comprenden el vehículo que puede ser sólido o líquido y los coadyuvantes que ayudan a mejorar o modificar la acción del principio activo. Los excipientes deben ser inertes frente al microorganismo y frente a las plagas (Espinel et al., 2008). La formulación tiene por objetivo: a) estabilizar el agente



biológico en la producción, distribución y almacenamiento, b) facilitar el manejo y aplicación del producto, c) proteger el agente biológico contra los factores ambientales adversos (UV, baja humedad relativa, altas temperaturas), aumentando su persistencia en el medio ambiente, d) aumentar o mantener la virulencia del agente biológico, aumentar su reproducción, el contacto y la interacción con la plaga (mejorar la adhesión) y, e) aumentar la seguridad del producto para el usuario, reduciendo el riesgo de inhalación, irritación de ojos, etc. (Burges y Jones, 1998). Para ser formulado, la viabilidad del hongo no debe ser menor de 95 % y el contenido de humedad debe estar entre 4 – 6 % (Vélez et al., 1997; Carballo, 1998; Monzón, 2001; Teera-Arunsiri et al., 2003). Los materiales utilizados en la formulación no deben tener actividad biológica ni afectar la actividad del hongo, deben ser inocuos al ambiente, presentar características físicas adecuadas para mezclarse con los conidios, facilitar la aplicación del producto y ser económicamente rentables (Carballo, 1998).

Estas consideraciones permiten inferir que se debería comenzar con la selección de cepas fúngicas efectivas sobre *T. limbativentris*, con la finalidad de arribar a la formulación de un micoinsecticida. Si se logra este objetivo, el impacto sobre el ambiente será positivo debido a que se podrá disminuir la dependencia actual de productos químicos para el control de la chinche del tallo del cultivo del arroz.

Los objetivos en esta etapa fueron:

- Seleccionar aislamientos de hongos entomopatógenos nativos o de micoteca por su patogenicidad y virulencia sobre adultos de *T. limbatriventis*.
- Determinar para la/s cepa/s fúngica/s seleccionada/s el Tiempo de Supervivencia Media (ST<sub>50</sub>) y la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) sobre adultos de *T. limbativentris* y su compatibilidad con diversos productos fitosanitarios usados frecuentemente en el cultivo del arroz.
- Evaluar la producción masiva de conidios de la/s cepa/s seleccionada/s sobre diversos sustratos en fermentación en medio sólido (FMS) y desarrollar una formulación experimental del micoinsectida.
- Evaluar la eficacia de los micoinsecticidas que mejores resultados brinden sobre adultos de *T. limbativentris* bajo condiciones de invernáculo.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Bioensayos

#### 3.2.1.1 Selección de hongos entomopatógenos para el control de *T. limbativentris*

Se evaluaron en total 32 aislamientos nativos de nuestro país de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bb), *Paecilomyces lilacinus* (Pl) y *Metarhizium anisopliae* (Ma) (Tabla 7).

**Tabla 7:** Origen de los aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bb), *Paecilomyces lilacinus* (Pl) y *Metarhizium anisopliae* (Ma) evaluados sobre adultos de *T. limbativentris*

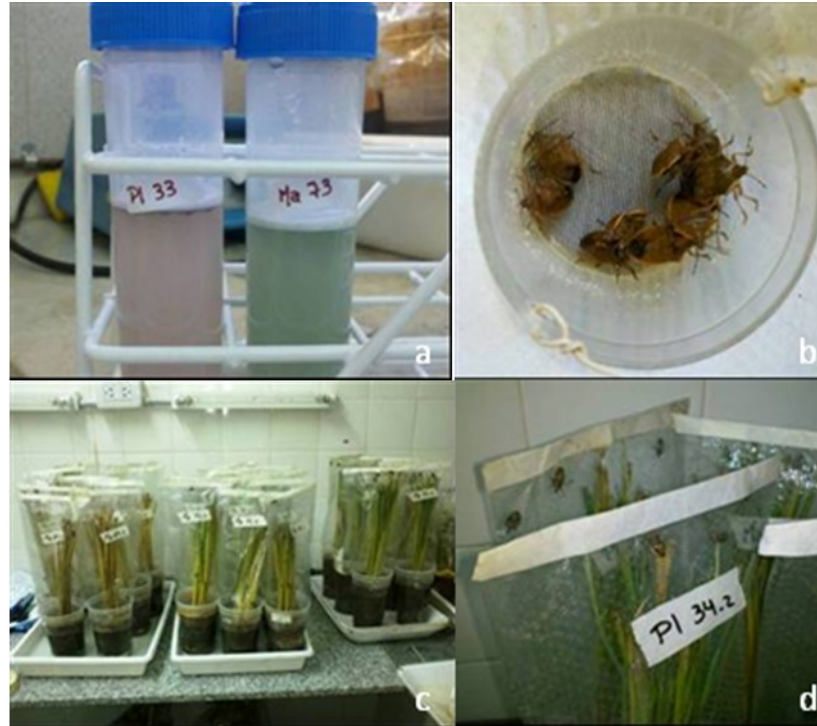
Aislamiento N°	Procedencia	Hospedante Original
Bb 23	Pergamino/BsAs/Arg.	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)
Bb 37	Oliveros/S. Fe/Arg.	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 59	Oliveros/S. Fe/Arg.	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 61	Oliveros/S. Fe/Arg.	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 62	Oliveros/S. Fe/Arg.	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 63	Oliveros/S. Fe/Arg.	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 64	Oliveros/S. Fe/Arg.	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 65	Oliveros/S. Fe/Arg.	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 66	Oliveros/S. Fe/Arg.	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 301	Reconquista/S. Fe/Arg.	<i>Dyscinetus hidrophiloides</i> (Col: Escarabeidae)
Bb 360	Los Conquistadores/E. Rios/Arg.	<i>Oebalus poecilus</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 361	Los Conquistadores/E. Rios/Arg.	<i>Oebalus poecilus</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 363	El Sombrero/Ctes/Arg.	<i>Tibraca limbativentris</i> (Hem: Pentatomidae)
Bb 364	El Sombrero/Ctes/Arg.	<i>Tibraca limbativentris</i> (Hem: Pentatomidae)
Pl 33	Mercedes/Ctes/Arg.	<i>Tibraca limbativentris</i> (Hem: Pentatomidae)
Pl 34	Los Conquistadores/E. Rios/Arg.	<i>Oebalus poecilus</i> (Hem: Pentatomidae)
Ma 20	Castelar/BsAs/Arg.	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hym: Formicidae)
Ma 45	Huerta Grande/Cba./Arg.	Suelo
Ma 46	Huerta Grande/Cba./Arg.	Suelo
Ma 47	Las Toscas/S. Fe/Arg.	Suelo
Ma 48	Las Toscas/S. Fe/Arg.	Suelo
Ma 49	Las Toscas/S. Fe/Arg.	Suelo
Ma 50	Las Toscas/S. Fe/Arg.	Suelo
Ma 64	Rosario/Sta Fe/Arg.	Suelo
Ma 65	Rosario/Sta Fe/Arg.	Suelo
Ma 66	Rosario/Sta Fe/Arg.	Suelo
Ma 69	Lujan/BsAs/Arg.	Suelo
Ma 70	Armstrong/Sta Fe/Arg.	Suelo
Ma 71	Armstrong/Sta Fe/Arg.	Suelo
Ma 72	Ita Ibate/Ctes/Arg.	<i>Tibraca limbativentris</i> (Hem: Pentatomidae)
Ma 73	Mercedes/Ctes/Arg.	<i>Tibraca limbativentris</i> (Hem: Pentatomidae)
Ma 74	Ita Ibate/Ctes/Arg.	<i>Tibraca limbativentris</i> (Hem: Pentatomidae)

Para la utilización de las cepas fue necesario realizar repiques y así obtener nuevos subcultivos de las mismas. El medio de cultivo utilizado fue PDA (Merk®) para *P. lilacinus* y *M. anisopliae*, mientras que se utilizó MC para *B. bassiana*. Las placas fueron incubadas durante 10 días a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , con 14 hs de fotofase para Ma y Pl, y oscuridad para Bb. A partir de estos nuevos repiques se prepararon las suspensiones. Los conidios producidos fueron colectados por raspado y transferidos a 9 ml de una solución de Tween 80 (0,05 %) y ajustada a  $5 \times 10^8$  conidios/ml utilizando una cámara de Neubauer. El día antes de la realización del ensayo, los insectos fueron desinfectados superficialmente.

Las unidades experimentales (UE) constaron de un vaso de 1 litro de capacidad, con una planta en su interior y con arena esterilizada; los vasos fueron perforados en la parte inferior e introducidos en un recipiente con agua para mantener la humedad, los mismos se cubrieron individualmente con una malla de polietileno transparente con perforaciones de aproximadamente 1 mm para mantener el intercambio gaseoso. En cada UE fueron colocados 5 adultos de *T. limbativentris* los cuales fueron sumergidos en las suspensiones fúngicas durante 15 segundos; el testigo se sumergió en 30 ml de solución de Tween 80 (0,05 %). El diseño experimental fue completamente al azar, con 3 repeticiones, cada uno con 5 insectos (Fig. 16). Después de la aplicación de los tratamientos, las UE fueron incubadas en cámara de crecimiento a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  con 14 horas de fotofase.

Las evaluaciones de mortalidad fueron diarias y por un período de 15 días. Los insectos muertos fueron desinfectados superficialmente, colocados en cámaras húmedas e incubados por 15 días a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  con 16 horas de fotofase, para confirmar la micosis.

Los datos fueron sometidos a análisis estadístico usando el Paquete estadístico R versión 2.12.0. Los datos de mortalidad de chinches de cada aislamiento fueron comparados mediante ANOVA a fin de seleccionar aquellos que causaron mayores mortalidades. Además se usó el Análisis de Supervivencia de Kaplan-Meier para determinar el tiempo de supervivencia media ( $ST_{50}$ ) de aquellas cepas que superaban el 50 % de mortalidad.



**Fig. 16:** Experimento I. Selección de Cepas. **a)** Suspensión fúngica; **b)** Adultos después de sumergidos en la suspensión; **c)** y **d)** Unidades experimentales

### 3.2.1.2 Evaluación de la virulencia de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* sobre adultos de *T. limbativentris*

Con la cepa seleccionada del bioensayo de selección de hongos entomopatógenos para el control de *T. limbativentris* (3.2.1.1) se calculó la  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  sobre los adultos de *T. limbativentris*. Para ello se realizó un ensayo de Probit con ocho suspensiones ( $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  conidios/ml) de la cepa. Se realizaron 2 repeticiones de 10 insectos adultos c/u, los cuales fueron sumergidos en las respectivas suspensiones y posteriormente colocados en cada UE. Después de la aplicación de los tratamientos, las UE fueron incubadas en cámara de crecimiento a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  con 14 horas de fotofase. Las evaluaciones de mortalidad fueron diarias y por un período de 15 días, los insectos muertos fueron llevados al laboratorio para confirmar la micosis a través de cámaras húmedas ( $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  y 16:8 L:O).

Se estimaron los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  usando el análisis Probit, mediante el uso del software POLO-PC (Haddad, 1998) basado en el método de Finney (Finney, 1971).

### 3.2.2 Evaluación de la compatibilidad de cepa Ma 72 de *M. anisopliae* con productos fitosanitarios

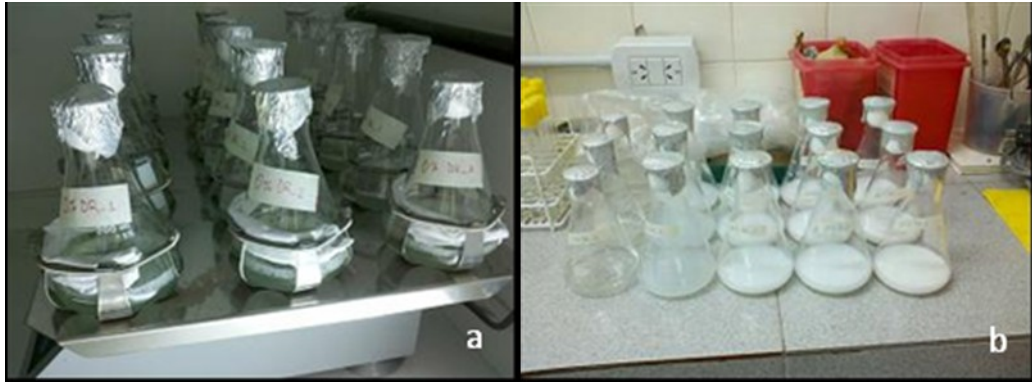
Se evaluó la compatibilidad *in vitro* de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* seleccionada por su efectividad sobre *T. limbativentris* mediante los bioensayos con adultos, frente a los diversos productos fitosanitarios comúnmente usados en el cultivo del arroz (Kraemer et al., 2008) (Tabla 8).

**Tabla 8:** Productos fitosanitarios usados comúnmente en el cultivo del arroz y utilizados en los bioensayos de compatibilidad con la cepa Ma 72 de *M. anisopliae*

Productos evaluados	Marca comercial	Categoría	Dosis recomendada
1) Glifosato 66,2%	Round Up Full II® SL <sup>1</sup>	H	3 lts/ha
2) Bispiribac Sodio 40%	Nominee 40® SC <sup>1</sup>	H	100 cm <sup>3</sup> /ha
3) Imazapic 17,2% + Imazapyr 52,5% + Coadyuvante	Kifix® WG <sup>1</sup>	H	210 gr/ha + Coad. 250 gr/ha
4) Cyahalofof Butil 19%	Clincher 200® EC <sup>1</sup>	H	1,8 lts/ha
5) Penoxsulam 24%	Ricer® SC <sup>1</sup>	H	180 cm <sup>3</sup> /ha
6) Sal potásica de picloram 28%	Tordon 24 K® SL <sup>1</sup>	H	100 cm <sup>3</sup> /ha
7) Thiametoxan 14,1% + Lamdacialotrina 10,6%	Engeo 247® SC <sup>1</sup>	I	300 cm <sup>3</sup> /ha
8) Imidacloprid 10% + Lamdacialotrina 1,25%	Comba® SC <sup>1</sup>	I	700 cm <sup>3</sup> /ha
9) Gammacialotrina 15%	Fighter Plus® SE <sup>1</sup>	I	100 cm <sup>3</sup> /ha

<sup>1</sup>Formulaciones: **SC**=Suspensión Concentrada, **SL**=Concentrado Soluble, **WG**=Granulo Dispersable, **EC**=Concentrado Emulsionable, **SE**=Suspensión de Encapsulado.  
Producto fitosanitario: **H**=Herbicida, **I**=Insecticida

Las concentraciones finales de las suspensiones fueron ajustadas a 10 %, 50 %, 100 %, y 200 % de la dosis recomendada por el fabricante del producto (DR), siguiendo la metodología de Lecuona et al., (2001). Se incorporaron 0,2 ml de la cepa Ma 72 con una concentración de  $5 \times 10^7$  conidios/ml a la suspensión para obtener un volumen final de la mezcla de 50 ml en frascos Erlenmeyer. Todos los tratamientos fueron comparados con un testigo representado por conidios agregados al agua sin ningún producto fitosanitario (0 % DR). Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento, incluyendo el testigo. Las mezclas fueron agitadas de forma continua a 180 rpm, por 16 horas y a 26 °C (Fig. 17).



**Fig. 17:** Suspensiones de la cepa Ma 72 de *Metarhizium anisopliae* mezclados con distintas dosis de agroquímicos: **a)** Suspensiones puestas en agitación constante durante 16 hs; **b)** Luego de las 16 hs de agitación y previo a la siembra en placa

Cada mezcla fue diluida en forma seriada hasta 10.000 veces y se sembraron 100  $\mu$ l en superficie sobre cajas de Petri con PDA más antibiótico (0,5 % clorafenicol) y posteriormente incubadas a 26 °C. Tres placas se sembraron por repetición. Las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron contadas 3 días más tardes. Estos datos fueron sometidos a análisis estadístico usando el Paquete estadístico R versión 2.12.0. Cada producto fitosanitario fue analizado por separado. Los datos las UFC de cada tratamiento fueron comparados mediante ANOVA por medio del test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### **3.2.3 Producción masiva de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* sobre diversos sustratos en fermentación en medio sólido (FMS)**

La producción de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* (seleccionada a partir de los bioensayos) se efectuó en FMS mediante los siguientes pasos (Fig. 19):

#### *Multiplicación del hongo en medio de cultivo artificial*

El hongo fue inicialmente cultivado en cajas de Petri con PDA más antibiótico (0,5 % cloranfenicol) para la obtención de conidios jóvenes. Estas placas fueron identificadas e incubadas en cámara climatizada a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 10 días.

#### *Multiplicación del hongo en medio sólido*

Los medios sólidos utilizados (sustratos) fueron: arroz parbolizado (testigo), arroz blanco entero, arroz quebrado, arroz cáscara, arroz integral, trigo descascarado y cáscara de arroz. Se colocaron 45 gr de cada medio sólido en bolsas de polipropileno y se adicionaron 22,5 ml de agua destilada estéril, una vez que el sustrato absorbió el agua, este se esparció dentro de la bolsa homogéneamente hasta lograr una lámina delgada. Las bolsas se cerraron mediante una bandita elástica y se

colocaron en autoclave durante 20 min a 121 °C y 1 Kg/cm<sup>2</sup> de presión. Una vez finalizado el ciclo, se dejó enfriar el sustrato y se inoculó bajo condiciones asépticas (dentro de una cabina de flujo laminar) con 100 µl/bolsa (45 gr sustrato) con una suspensión de  $8,5 \times 10^6$  conidios viables/ml de la cepa Ma 72. Las bolsas fueron cerradas por medio de una engrapadora y agitadas por aproximadamente 2 minutos y posteriormente se incubaron a 26 °C durante 12 días (Fig. 18a). Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento, incluyendo el testigo.

#### *Secado de los conidios*

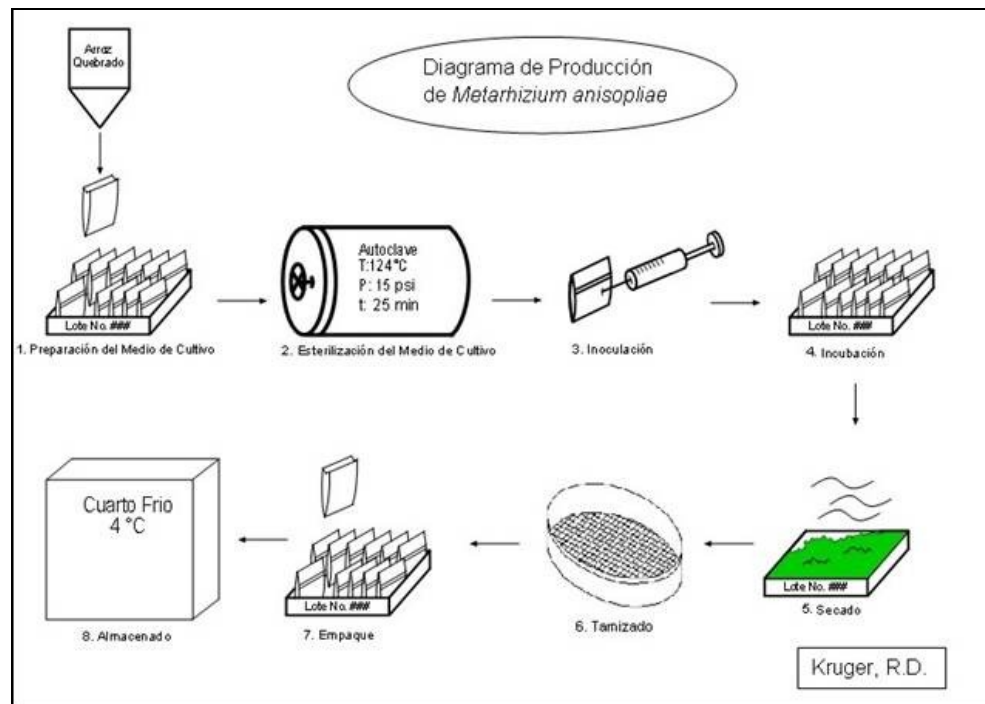
Finalizado el tiempo de incubación, las bolsas se abrieron en una sala aséptica con un flujo de aire a  $29 \pm 1$  °C en total oscuridad durante un periodo de 48 hs. Además, se utilizaron dos deshumidificadores para acelerar el proceso de secado de los sustratos fermentados hasta una HR < 10 % (Fig. 18b).

#### *Separación de los conidios del sustrato*

Para separar los conidios de los granos de arroz, se tamizó cada tratamiento por separado, durante 20 min a 460 rpm, por medio de una malla metálica de 300 micras (Fig. 18c).



**Fig. 18:** Producción de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* en fermentación en medio sólido: **a)** Diferentes sustratos esterilizados; **b)** Secado de las esporas (conidios); **c)** Separación del polvo de conidios del sustrato; **d)** Almacenamiento de conidios en cámara de frío.



**Fig. 19:** Esquema de producción de la cepa Ma 72 de *Metarhizium anisopliae*

#### Evaluaciones realizadas

Con el polvo de conidios obtenido se calcularon los siguientes parámetros:

- 1- Gramos de polvo de conidios producido por kilogramos de sustrato. Se pesaron los polvos tamizados de cada tratamiento y su repetición por separado. Posteriormente se calculó el porcentaje de humedad de cada uno por medio del método gravimétrico (en una estufa a 80-90°C hasta peso constante).
- 2- Número de conidios por gramo de polvo de conidios. Para calcularlo se retiraron 0,05 gramos de polvo de conidios de cada tratamiento y su repetición y el conteo se realizó con ayuda de una Cámara de Neubauer (aumento de 400 veces).
- 3- Número de conidios por kilogramo de sustrato. El mismo se obtiene a partir de los datos anteriores (Número de conidios/kilogramos sustrato = gramos polvo de conidios/kilogramo sustrato \* número de conidios/gramos polvo de conidios).
- 4- Viabilidad de los conidios. Para determinar la viabilidad se tomó una proporción de polvo de conidios (0,15 – 0,2 mg) con una espátula y se transfirió a tubos con 10 ml de Tween 80 (0,05 %). De cada suspensión se sembraron 100 µl en superficie sobre cajas de Petri con PDA más antibiótico (0,5 % clorafenicol) y posteriormente incubadas a 26 °C. Después de 24 horas de incubación, se realizó la lectura de la germinación con ayuda de un microscopio óptico con aumento de 400 veces.



Los datos fueron sometidos a análisis estadístico usando el Paquete estadístico R versión 2.12.0. Los parámetros de producción evaluados de cada tratamiento fueron comparados mediante ANOVA por medio del test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) a fin de utilizarlos como criterio de selección.

### 3.2.4 Selección de coadyuvantes de formulación según su compatibilidad con la cepa Ma 72 de *M. anisopliae*

Se obtuvieron los conidios puros de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* incubados en PDA y se preparó una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidios/ml; posteriormente se agregaron los aditivos de acuerdo con el tratamiento correspondiente (Tabla 9). Cada suspensión fue mantenida sobre agitación por aproximadamente 2 horas, a temperatura ambiente. De cada tratamiento se sembraron 100  $\mu$ L en seis cajas de Petri con medio en PDA más antibiótico (0,5 % cloranfenicol). Las cajas se incubaron a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y al cabo de 24 y 48 horas se determinó la germinación de los conidios mediante observación al microscopio óptico con aumento de 400 veces.

**Tabla 9:** Coadyuvantes de formulación analizados

Trat.	Principio activo	Marca comercial	Categoría	Dosis evaluada
1	Polisorbato éster	Tween 80	Tensoactivo No ionico y emulsionante	5% v/v
2	Alcoxilato de alcoholes grasos lineares	Plurafac	Coadyuvante- Humectante-	5% v/v
3			Adherente No ionico	10% v/v
4	Aceite minarel - Mezcla de hidrocarburos saturados	Bayer Xtra	Coadyuvante emulsionable	5% v/v
5				10% v/v
6	Corrector de pH	Total I	Corrector- Secuestrante	1,5% v/v
7	Aceite Vegetal de Soja	Oleo	Coadyuvante No ionico	5% v/v

Los aditivos usados se emplean habitualmente como coadyuvantes y tienen como función mejorar la dispersión de los productos aplicados. El coadyuvante Bayer Xtra® es un aceite emulsionable (formulación compleja de hidrocarburos saturados con un número de carbonos dentro del intervalo de C15 – C50) que se usa con graminicidas. El Plurafac® es un coadyuvante, humectante y adherente (mezcla de alcoxilato de alcoholes grasos lineares) especialmente indicado para su aplicación conjunta con el herbicida Facet en el cultivo de arroz. El Tween 80® (polisorbato 80), es un tensoactivo no iónico y emulsionante que se utiliza en bioensayos para permitir la dispersión de esporas del hongo en agua. El Oleo® es un aceite vegetal de soja (alta viscosidad y baja

volatilidad), mientras que el Total I®, es un corrector de pH y secuestrante de cationes.

El diseño experimental fue completamente al azar. Los datos fueron sometidos a análisis estadístico usando el Paquete estadístico R versión 2.12.0. Los datos de germinación de cada tratamiento fueron comparados mediante ANOVA por medio del test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) a fin de utilizarlos como criterio de selección.

### 3.2.5 Ensayos de diferentes formulaciones experimentales sobre la viabilidad en el almacenamiento de conidios de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae*

Se evaluaron dos tipos de formulaciones: Polvo Mojable (PM) y Concentrado Emulsionable (CE) y dos temperaturas de almacenamiento: 6 y 20 °C, sobre la viabilidad de conidios de la cepa Ma 72 (Tabla 10 y Fig. 20). Se utilizó esta cepa en este experimento debido a que es altamente virulenta contra la chinche del tallo, *T. limbativentris*.

**Tabla 10:** Ensayo de formulaciones a diferentes temperaturas de almacenamiento

Trat.	Almacenamiento	Formulado	Principio activo	Inertes
1	6 °C		100% Conidios puros	-
2	6 °C	Polvo Mojable (PM)	15% Conidios puros	85% Fecula Maíz
3	6 °C			85% Talco mineral
4	6 °C			85% Arroz molido
5	6 °C			85% Oleo
6	6 °C	Oleo Emulsionable Concentrado(CE)	15% Conidios puros	80% Oleo + 5% Plurafac
7	6 °C			80% Oleo + 5% Bayer Xtra
8	6 °C			80% Oleo + 5% Tween 80%
9	20 °C		100% Conidios puros	-
10	20 °C	Polvo Mojable (PM)	15% Conidios puros	85% Fecula Maíz
11	20 °C			85% Talco mineral
12	20 °C			85% Arroz molido
13	20 °C			85% Oleo
14	20 °C	Oleo Emulsionable Concentrado(CE)	15% Conidios puros	80% Oleo + 5% Plurafac
15	20 °C			80% Oleo + 5% Bayer Xtra
16	20 °C			80% Oleo + 5% Tween 80%



**Fig. 20:** Formulación de la cepa Ma 72 de *Metarhizium anisopliae*: **a)** Polvo Mojable (PM): Pre-mezcla de polvo de *M. anisopliae* más inerte; **b)** Concentrado Emulsionable (CE): Pre-mezcla de polvo *M. anisopliae* más oleo y coadyuvantes; **c)** Formulaciones terminadas

Los conidios fueron obtenidos del ensayo de producción, en donde una vez evaluados se realizó una mezcla de aproximadamente 20 minutos de todos los tratamientos (excepto trigo y cascara de arroz ya que poseían restos del sustrato además de conidios). Basados en los parámetros de productividad (número de conidios por gramo) y de calidad (viabilidad de los conidios) se estimó el porcentaje de principio activo que debería tener el formulado, para lograr una dosis de  $2 \times 10^{12}$  conidios viables/ha en un formulado de 1 litro. Para todos los formulados se estandarizó en un 15 % de principio activo, excepto para el testigo que lleva el 100 % de conidios puros secos, como un estándar para comparaciones generales. Se utilizaron tubos de 15 ml de capacidad y se sellaron con algodón más una cobertura de polipropileno para evitar el intercambio de humedad y aire. Una vez preparado todos los formulados se almacenaron a 6 y 20 °C.

La mezcla de los formulados en base a PM se realizó con ayuda de un mezclador durante 5 minutos. Para los formulados en base a CE la mezcla se realizó con la ayuda de un vortex durante 5 minutos, para romper las cadenas de conidios y reducir la formación de grumos.

La viabilidad inicial de los conidios se evaluó en tres momentos: previo al almacenamiento, a los 50 y 100 días de almacenados. Para facilitar el conteo de germinación, se tomó una alícuota de 1 ml o gr (que contiene aproximadamente  $5,5 \times 10^9$  conidios) de cada tratamiento/repetición de los formulados almacenados y se realizó una suspensión que se ajustó a  $5 \times 10^7$  conidios/ml, se sembraron 100  $\mu$ L de la suspensión en tres cajas de Petri con medio PDA más antibiótico (0,5 % cloranfenicol). Las cajas se incubaron a 25 °C y al cabo de 24 horas se determinó la germinación de los conidios mediante observación al microscopio óptico con aumento de 400 veces (Moore et al., 1993). Con esta evaluación se determinó la pérdida de viabilidad de los conidios en el tiempo.

Este experimento tuvo un diseño factorial con 16 tratamientos, dos principales factores (formulaciones con ocho niveles y la temperatura con dos niveles) y con dos replicas de cada tratamiento. El tiempo de almacenamiento se analizó por separado. Los datos de viabilidad de conidios fueron sometidos a análisis estadístico usando el Paquete estadístico R versión 2.12.0 y comparados mediante ANOVA por medio del test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### ***3.2.6 Evaluación en condiciones controladas de la eficacia de los micoinsecticidas sobre adultos de *T. limbativentris****

Este experimento fue realizado en la EEA Corrientes – INTA. Para este ensayo se infectaron plantas de arroz con 69 días de edad, ubicadas en jaulas, con 10 adultos de *T. limbativentris* por cada unidad experimental (Fig. 21a), obtenidos de la cría de este insecto y aplicando una suspensión acuosa de los formulados con la cepa Ma 72 (Tabla 11). El material fúngico fue producido mediante FMS en bolsas de polipropileno. Se elaboraron los formulados seleccionados en base a los parámetros de productividad (número de conidios por gramo) y de calidad (viabilidad de los conidios) para lograr que el formulado contenga el porcentaje de principio activo necesario para lograr una dosis de  $2 \times 10^{12}$  conidios viables/ha en un formulado de 1 litro (Fig. 21b).

El diseño experimental fue completamente al azar, con 3 repeticiones por cada tratamiento. Para la aplicación se utilizó un pulverizador de mochila presurizado con CO<sub>2</sub>, utilizando un caudal 150 litros por hectárea. Después de la aplicación de los tratamientos, las UE fueron colocadas en condiciones de invernáculo (aproximadamente 30 °C, 70 % HR y un Fotoperiodo de 13:11 (L:O) y el riego fue controlado para mantener el suelo saturado, mediante un aprovisionamiento desde la parte inferior de las macetas.

**Tabla 11:** Ensayo de eficacia en condiciones de invernáculo

<i>Trat.</i>	<i>Producto aplicado</i>	<i>Dosis p.a.</i> (N° conidios/ha)	<i>Dosis Formulado</i>
1	Testigo (sin aplicación)	0	0
2	PM: 100% Conidios Puros Ma 72	2,00E+12	40 gramos/ha <sup>1</sup>
3	PM: 15% Ma 72 + 85% Arroz molido	2,00E+12	500 gramos/ha
4	CE: 15% Ma 72 + 80% Oleo + 5% Bayer Xtra	2,00E+12	500 gramos/ha
5	CE: 15% Ma 72 + 80% Oleo + 5% Tween 80%	2,00E+12	500 gramos/ha

<sup>1</sup>Se obtuvo una concentración de  $5,75 \times 10^{10}$  esporas/gramos de conidios y 91,73 % de viabilidad de conidios.



**Fig. 21:** Material para el ensayo de eficacia: **a)** Unidades experimentales, plantas de arroz variedad “Fortuna INTA”; **b)** Formulados de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* seleccionados para el ensayo de eficacia en condiciones de invernáculo

Las evaluaciones de mortalidad fueron realizadas diariamente durante 30 días. Solamente las chinches muertas con micosis confirmada se utilizaron para el análisis de virulencia.

Los datos de mortalidad de chinches de cada formulado fueron sometidos a análisis usando el Paquete estadístico R versión 2.12.0 y comparados mediante ANOVA a fin de seleccionar aquellos que causaron mayor mortalidad. Además se usó el Análisis de Supervivencia de Kaplan-Meier para determinar el tiempo de supervivencia media (ST<sub>50</sub>) de aquellas cepas que superaban el 50 % de mortalidad. La eficiencia del control

ejercida por la cepa Ma 72 sobre *T. limbativentris* fue evaluada mediante el porcentaje de mortalidad, corregido por la fórmula de Abbott (1925). Se registraron las condiciones ambientales presentes durante el periodo en el cual se llevó adelante el ensayo de eficacia por medio del uso de un Data logger Cavadevices<sup>®</sup> de 8 canales (3 sensores de temperatura del aire, 1 sensor de humedad relativa ambiente, 1 sensor de radiación solar PAR).

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.3.1 Bioensayos

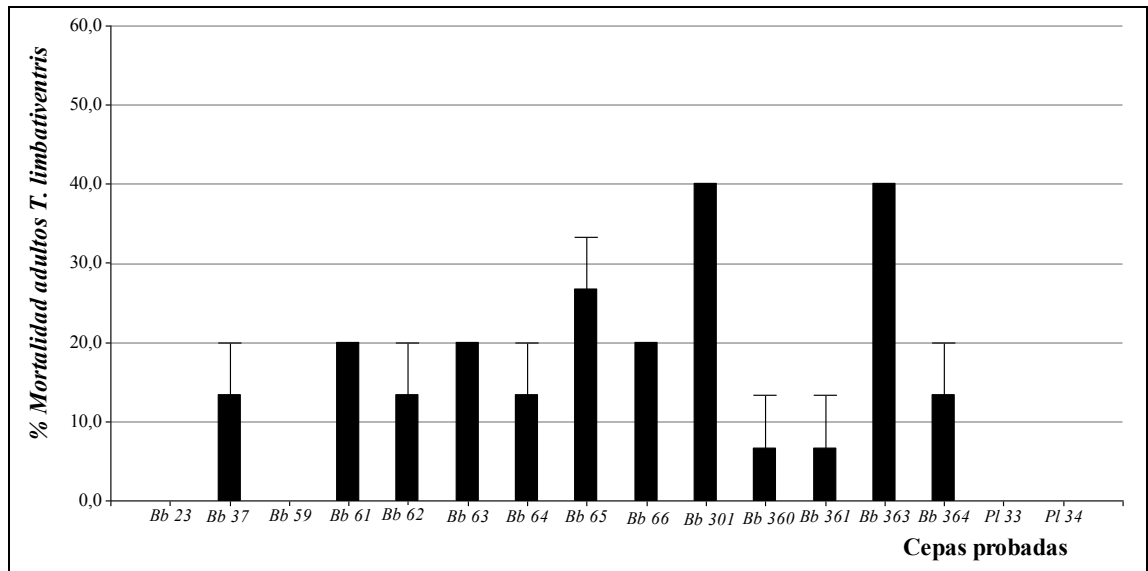
##### 3.3.1.1 Selección de hongos entomopatógenos para el control de *T. limbativentris*

Se observó una variabilidad en cuanto al porcentaje de mortalidad causado por las distintas cepas de hongos entomopatógenos evaluadas ( $F= 32,53$ ;  $gl= 32, 66$ ;  $P < 0,0001$ ). De las cepas utilizadas de *B. bassiana* (Bb) ninguna superó el 50 % de mortalidad en adultos de *T. limbativentris*. Las dos cepas que mejor comportamiento presentaron fueron la Bb 301 y la Bb 363 que provocaron un 40 % de mortalidad (Fig. 22). De las cepas aisladas de *P. lilacinus* (Pl) no se pudo confirmar ningún insecto muerto. Solamente 5 cepas de las 16 utilizadas de *M. anisopliae* (Ma) superaron el 50 % de mortalidad confirmada por crecimiento fúngico sobre los insectos tratados (Fig. 23).

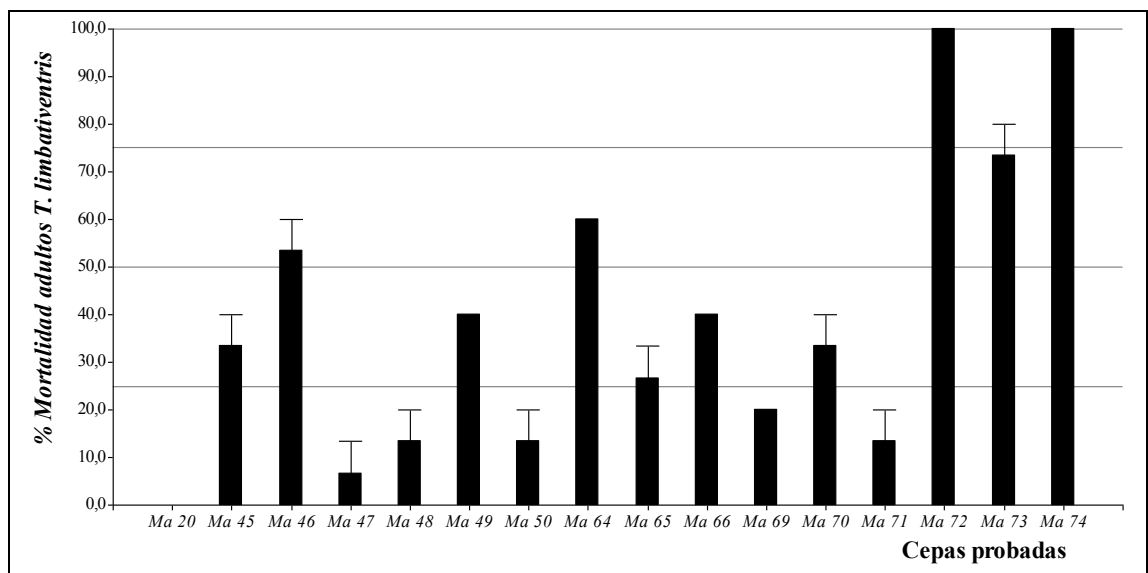
La cepas Ma 72 y Ma 74, ambas provenientes de adultos de *T. limbativentris* de Itá Ibaté, lograron provocar la muerte confirmada de la totalidad de los adultos de *T. limbativentris* (10 y 11 días, respectivamente; Fig. 23), y además fueron las más virulentas con un  $ST_{50}$  de 8 días para ambas cepas (Fig. 24). Mientras que con la cepa Ma 73, proveniente de la zona de Mercedes, se logró un control del 73,3 % (Fig. 23), y el  $ST_{50}$  fue de 13 días para los adultos de la chinche (Fig. 24). Con las cepas Ma 46 y Ma 64, se confirmó la muerte de más del 50 % de adultos de *T. limbativentris* (Fig. 23), y el  $ST_{50}$  fue de 12 y 13 días respectivamente. En Brasil, Martins et al., (1986) observaron la ocurrencia de *M. anisopliae* sobre adultos y ninfas de *T. limbativentris* criadas sobre plantas de arroz dentro de jaulas y constataron que la infección era superior al 90 %. Rampelotti et al., (2005) demostraron un control superior al 70 % sobre la chinche del tallo con la cepa de *M. anisopliae* CG 891 y Frizzo et al., (2005) usando una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml lograron un control de esta plaga del 75 %, 25 % y 50 % con los hongos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*, respectivamente.

Los resultados del presente trabajo mostraron diferencias de mortalidad entre las cepas testeadas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre adultos de *T. limbativentris*, concluyéndose que las cepas Ma 72 y Ma 74 (Fig. 25) serían promisorias para el control de esta plaga. Sin embargo, la cepa Ma 72 logró un control del 100 % de *T. limbativentris* en solo 10 días, un día menos con respecto a la cepa Ma 74, además, la  $ST_{90}$  fue de 9 días para la Ma 72, mientras que con la cepa Ma 74 se necesitaron 11 días

para lograr el control del 90 % de adultos de *T. limbativentris* (Fig. 24), por lo que sería importante continuar con los ensayos de  $CL_{50}$  y posteriores estudios de compatibilidad de la cepa Ma 72 con agroquímicos usados habitualmente en la región arrocerá. Esta es la base para introducir a los hongos entomopatógenos, como táctica de control microbiano de manera consistente y exitosa en un programa de MIP.

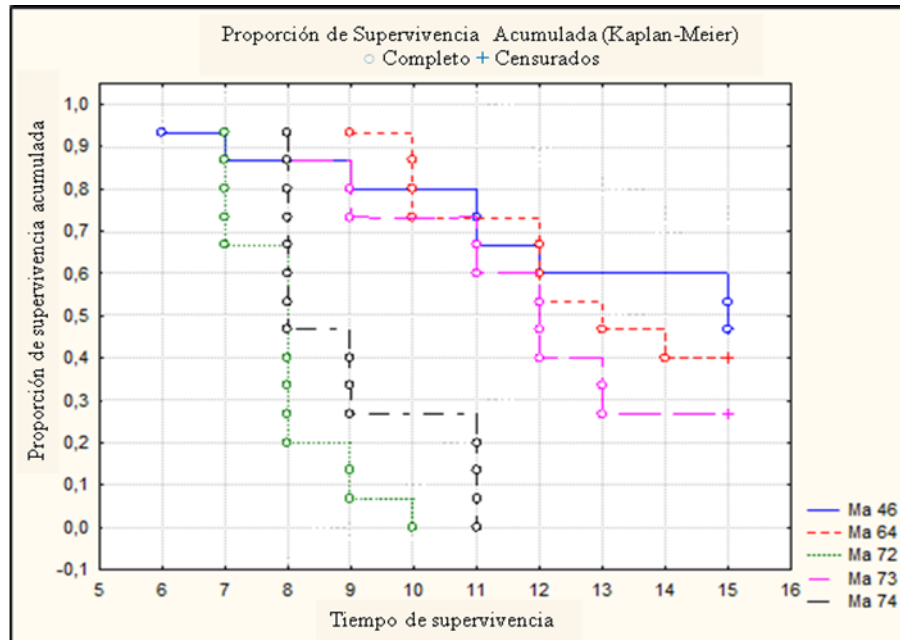


**Fig. 22:** Porcentaje de mortalidad de adultos de *T. limbativentris*, para las diversas cepas de *Beauveria bassiana* (Bb) y de *Paecilomyces lilacinus* (Pl).

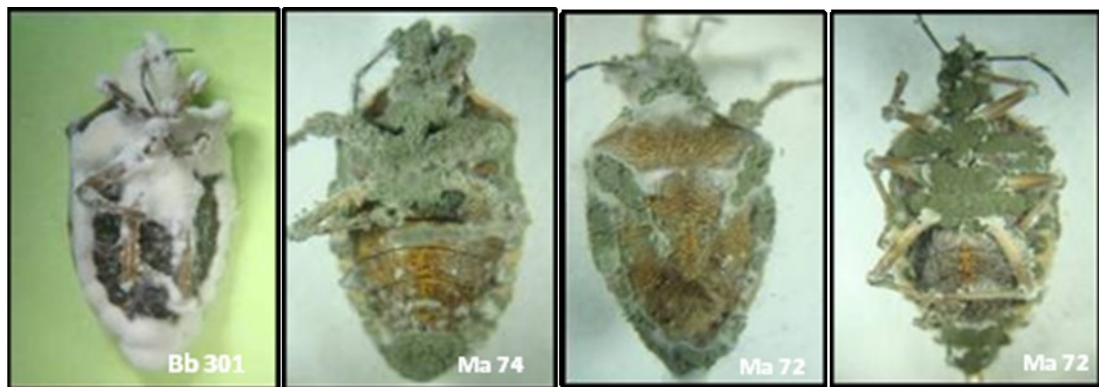


**Fig. 23:** Porcentaje de mortalidad de adultos de *T. limbativentris*, para las diversas cepas de *Metarhizium anisopliae* (Ma).





**Fig. 24:** Proporción de supervivencia acumulada de adultos de *T. limbativentris*, para las cepas más virulentas de *M. anisopliae* (Ma).



**Fig. 25:** Crecimiento miceliano y esporulación de algunas cepas usadas en el Bioensayo de selección.

### 3.3.1.2 Evaluación de la virulencia de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* sobre adultos de *T. limbativentris*

El porcentaje de mortalidad de las distintas concentraciones de inóculo fue evaluado el día 13 después de la inoculación, tiempo necesario para que se produjera el 100 % de mortalidad de adultos con la mayor concentración de inóculo ( $1 \times 10^9$  conidios/ml). La  $CL_{50}$  obtenida para la cepa Ma 72 fue de  $1,81 \times 10^7$  y la  $CL_{90}$  de  $1,44 \times 10^8$  (Fig. 26). El aumento de la mortalidad de chinches con las distintas concentraciones de inóculo se ajustó a un curva sigmoidea, lo que fue corroborado con el test de Chi cuadrado para bondad de ajuste ( $P < 0,01$ ;  $X^2 = 4,88$ ;  $R^2 = 0,95$ ) (Gómez y Gómez, 1984). Con un 95 % de confianza, los valores de  $CL_{50}$  ( $LI = 1,04 \times 10^7$  c/ml y LS

=  $3.25 \times 10^7$  c/ml) y  $CL_{90}$  ( $LI = 8.08 \times 10^7$  c/ml y  $LS = 6.08 \times 10^8$  c/ml), no hubo solapamiento lo que indica que estos valores difieren significativamente. La estimación de  $CL_{50}$  permitió detectar la concentración efectiva para controlar el 50 % de la población de chinches, mostrando la virulencia que tiene esta cepa para el control de adultos de *T. limbativentris*. Rezende et al., (2008) determinaron la  $CL_{50}$  y la  $CL_{90}$  para huevos de *T. limbativentris* con la cepa CP 172 de *M. anisopliae* en condiciones de laboratorio, obteniéndose una  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  de  $5,8 \times 10^5$  y  $1,7 \times 10^7$  conidios/ml respectivamente.

Estos resultados demuestran que la concentración efectiva de la cepa Ma 72 que nos permita controlar el 50 % ( $CL_{50}$ ) de la población de *T. limbativentris* fue de  $1,81 \times 10^7$  y la  $CL_{90}$  de  $1,44 \times 10^8$  c/ml. Un bajo valor de la  $CL_{50}$  indica una alta virulencia de los hongos, requiriendo bajas cantidades de conidios infectivos para eliminar la mitad de la población de esta plaga (Bittencourt et al, 1997).

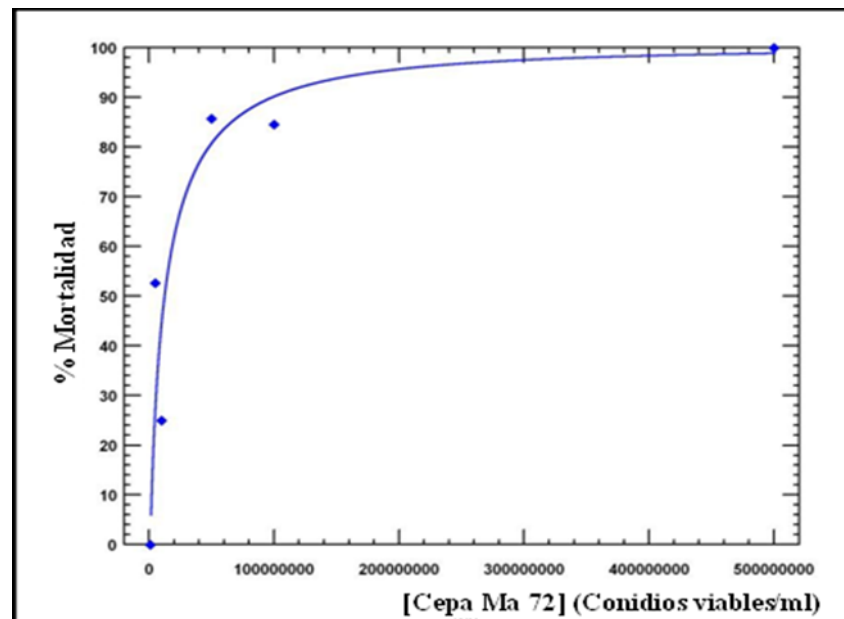


Fig. 26: Porcentaje de Mortalidad de adultos de *T. limbativentris* para las diversas concentraciones de la cepa Ma 72 de *Metarhizium anisopliae*

### 3.3.2 Evaluación de la compatibilidad de cepa Ma 72 de *M. anisopliae* con productos fitosanitarios

Los resultados del ensayo de compatibilidad fueron muy variables dependiendo del componente activo y de la concentración utilizada (Tabla 12).

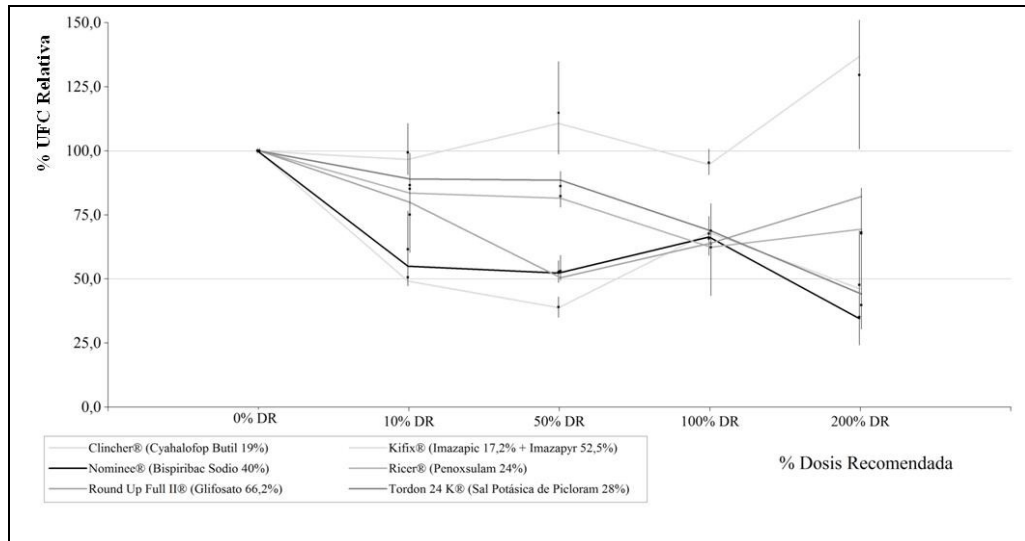
**Tabla 12:** Valores de UFC por mililitro de Ma 72 de *Metarhizium anisopliae* con herbicidas e insecticidas usados comúnmente en el cultivo del arroz

Productos evaluados	Tratamientos							p-value	CV (%)
	0% DR (Control)	10% DR	50% DR	100% DR	200% DR				
Round Up Full II (glifosato)	2,14 x 10 <sup>5</sup>	1,60 x 10 <sup>5</sup> A <sup>a</sup>	1,14 x 10 <sup>5</sup> B	1,33 x 10 <sup>5</sup> A B	1,45 x 10 <sup>5</sup> A B		0,0491	23,11	
Nominee (Bispiribac Sodio)	1,85 x 10 <sup>5</sup> A	1,14 x 10 <sup>5</sup> B	9,77 x 10 <sup>4</sup> B C	1,25 x 10 <sup>5</sup> B C	6,50 x 10 <sup>4</sup> C		0,0002	16,03	
Kifix (Imazapic + Imazapyr) + Coad.	2,60 x 10 <sup>5</sup> A	1,31 x 10 <sup>5</sup> B	1,01 x 10 <sup>5</sup> B	1,71 x 10 <sup>5</sup> B	1,24 x 10 <sup>5</sup> B		0,0002	17,2	
Clincher (Cyhalofop Butil)	4,96 x 10 <sup>4</sup> A	4,93 x 10 <sup>4</sup> A	5,70 x 10 <sup>4</sup> A	4,73 x 10 <sup>4</sup> A	6,43 x 10 <sup>4</sup> A		0,0107	14,4	
Ricer (Penoxsulam)	2,56 x 10 <sup>5</sup> A	2,22 x 10 <sup>5</sup> A B	2,11 x 10 <sup>5</sup> A B	1,64 x 10 <sup>5</sup> B	1,75 x 10 <sup>5</sup> B		0,0053	11,73	
Tordon 24 K (Sal potásica de picloram)	2,55 x 10 <sup>5</sup> A	2,17 x 10 <sup>5</sup> A B	2,20 x 10 <sup>5</sup> A B	1,76 x 10 <sup>5</sup> B	1,02 x 10 <sup>5</sup> C		0,0004	11,67	
Engeo (Thiametoxan + Lamdacialotrina)	3,23 x 10 <sup>5</sup> A	1,77 x 10 <sup>5</sup> B	1,78 x 10 <sup>5</sup> B	1,84 x 10 <sup>5</sup> B	1,63 x 10 <sup>5</sup> B		< 0,0001	7,94	
Comba (Imidacloprid + Lamdacialotrina)	2,59 x 10 <sup>5</sup> A	2,45 x 10 <sup>5</sup> A	2,72 x 10 <sup>5</sup> A	1,56 x 10 <sup>5</sup> B	1,56 x 10 <sup>5</sup> B		< 0,0001	8,67	
Fighter Plus (Gammaciacialotrina)	2,05 x 10 <sup>5</sup> A	1,59 x 10 <sup>5</sup> A B	1,21 x 10 <sup>5</sup> C	1,62 x 10 <sup>5</sup> B	7,95 x 10 <sup>4</sup> C		0,0024	17,46	

DR: Dosis Recomendada por el fabricante del producto

<sup>a</sup>Para cada producto químico: Medias seguidas por la misma letra dentro de la misma fila NO difieren estadísticamente (P < 0,05, prueba de Tukey)

La combinación de los conidios de la cepa Ma 72 con los herbicidas Round Up Full II (Glifosato 66,2 %) ( $F= 3,45$ ;  $gl= 4, 10$ ;  $P < 0,05$ ) y Clincher (Cyahalofof Butil 19 %) ( $F= 2,52$ ;  $gl= 4, 10$ ;  $P < 0,05$ ) no mostraron diferencias significativas, inclusive hasta el 200 % DR ( $P < 0,05$ ) (Fig. 27). Por otro lado, los herbicidas Ricer (Penoxsulam 24 %) ( $F= 7,21$ ;  $gl= 4, 10$ ;  $P < 0,05$ ) y Tordon 24 K (Sal Potásica de Picloram 28 %) ( $F= 18,83$ ;  $gl= 4, 10$ ;  $P < 0,05$ ), no presentaron diferencias significativas hasta el 50 % DR ( $P < 0,05$ ). Para los herbicidas Ricer y Tordon la exposición de los conidios al 100 % DR los afectó parcialmente con una reducción media del 36,15 % y 31,18 %, respectivamente, lo cual muestra que esta cepa es compatible con estos productos (Fig. 27). Los herbicidas Nominee (Bispiribac Sodio 40 %) ( $F= 16,56$ ;  $gl= 4, 10$ ;  $P < 0,05$ ) y Kifix (Imazapic 17,2 % + Imazapyr 52,5 %) + Coadyuvante ( $F= 3,22$ ;  $gl= 4, 10$ ;  $P < 0,05$ ), disminuyeron significativamente el número de UFC al 10 % DR ( $P < 0,05$ ), afectando la viabilidad en un 38,49 % y 49,36 % al 10 % DR respectivamente, y reduciendo en promedio para ambos un 60 % la viabilidad a 200 % DR de estos herbicidas (Fig. 27).

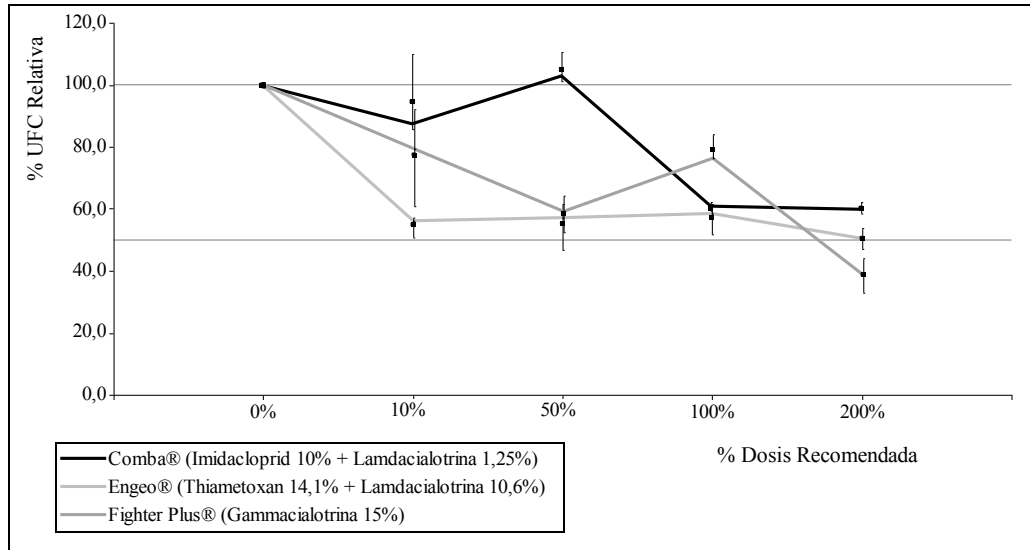


**Fig. 27:** Porcentaje de Colonias formadoras de unidades (UFC) de Ma 72 de *Metarhizium anisopliae* con distintas dosis de herbicidas usados en el cultivo del arroz.

Estos resultados concuerdan con lo expresado por Rampelotti et al., (2007b) quienes no encontraron efecto negativo en la germinación de los conidios de la cepa CG 891 de *M. anisopliae* para los herbicidas Basagran (Bentazon 60 %), Gamit (Clomazone 50 %), Roundup (Glifosato 36 %), Facet (Quinclorac 50 %) y Sirius (Pirazosulfuron etil 25 %). Por otra parte, Rampelotti et al., (2010) evaluaron la compatibilidad *in vitro*

entre la cepa CG 891 de *M. anisopliae* con diversos agrotóxicos utilizados en el cultivo del arroz y observaron reducciones significativas en el crecimiento vegetativo y esporulación de este hongo con los insecticidas Fenitrothion y Carbofuran, con el herbicida Glifosato y Pirazosulfuron etil y también con el fungicida Azoxistrobina, que provocó asimismo una reducción en la germinación. Mientras tanto, los herbicidas Bentazon, Clomazone y Quinclorac y el fungicida Triciclazole no causaron reducciones significativas.

La combinación de la cepa Ma 72 junto con los insecticidas reveló que éstos afectan significativamente la viabilidad del hongo, pero muestran un comportamiento diferencial. El insecticida Comba (Imidacloprid 10 % + Lamdacialotrina 1,25 %) mostró una disminución significativa en la viabilidad a partir del 100 % DR ( $F= 27,44$ ;  $gl= 4, 10$ ;  $P < 0,05$ ), del 39,88 % en promedio; a diferencia de los insecticidas Engeo (Thiametoxan 14,1 % + Lamdacialotrina 10,6 %) ( $F= 49,78$ ;  $gl= 4, 10$ ;  $P < 0,05$ ) y Fighter Plus (Gammacialotrina 15 %) ( $F= 2,36$ ;  $gl= 4, 10$ ;  $P < 0,05$ ), en los cuales se observaron una disminución significativa a partir del 10 % DR, en promedio del 45,30 % y 22,53 % respectivamente (Fig. 28).



**Fig. 28:** Porcentaje de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de Ma 72 de *Metarhizium anisopliae* con distintos dosis de insecticidas usados en el cultivo del arroz

Lecuona et al., (2001) observaron que la mezcla con insecticidas (Deltametrina y Beta-Cipermetrina) al 100 % y el 200 % DR causaron la inhibición de varias cepas de hongos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, por lo cual sólo podrían ser usados en combinación con los hongos a bajas dosis. Mientras que Bahiense et al., (2006) hallaron

una buena compatibilidad entre el hongo *M. anisopliae* y varias concentraciones del piretroide Deltametrina. Por otro lado, Batista Filho et al., (2001), evaluaron la compatibilidad del insecticida Tiametoxan y no observaron reducciones significativas en cuanto al número de conidios, ni tampoco en el crecimiento de *M. anisopliae* y de otros entomopatógenos. Dos Santos, (2008) no encontró diferencias en la germinación de la cepa URPE-6 y URPE-19 de *M. anisopliae* para los insecticidas Nim (Insecticida Natural), Clorfenapir, Indexacarb, Espinosad y Abamectin en concentraciones del 0,25x; 0,5x y 1x de la dosis recomendada. Li y Holdom (1994) observaron que los insecticidas clorados fueron el grupo más nocivo para los hongos entomopatógenos, mientras que los insecticidas del grupo carbamato (Carbofuran, Metomil y Oxamil) fueron tóxicos al crecimiento micelial y a la esporulación de *M. anisopliae*.

Según Alves et al., (1998b) la finalidad del empleo del insecticida químico en subdosis en asociación a los hongos entomopatógenos ayuda a provocarle un estrés al insecto, facilitando la infección por el hongo y su rápida proliferación. Barbosa et al., (2011), hacen referencia a que la asociación puede ser usada en áreas con un alto nivel poblacional de plagas y donde el insecticida químico causa un efecto “knock-down” (choque), controlando diferentes formas biológicas de la plaga y que el hongo pueda controlar a las próximas generaciones que surgen. Según Parella y Lewis (1997), la adopción de un agente de control microbiano, tal como *Metarhizium*, en un programa MIP a menudo provoca una reducción general de los insecticidas aplicados.

La utilización de hongos entomopatógenos representa una alternativa de control, observándose que la cepa Ma 72 sería un agente promisorio para el control de *T. limbativentris*, y una posible asociación con productos fitosanitarios resulta una buena estrategia para programas de MIP de plagas en arroz. La asociación de este entomopatógeno con productos fitosanitarios puede servir para aumentar su eficiencia contribuyendo a una reducción en el uso de insecticidas por parte de los agricultores, volviéndose un sistema menos agresivo al ambiente.

### ***3.3.3 Producción masiva de la cepa Ma 72 sobre diversos sustratos en fermentación en medio sólido (FMS)***

Al analizar la producción de conidios de la cepa Ma 72 en diferentes sustratos bajo fermentación en medio sólido (FMS), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 13).

**Tabla 13:** Producción de conidios de Ma 72 de *Metarhizium anisopliae* sobre diferentes sustratos sólidos.

<i>Trat.</i>	<i>Medios sólidos:</i>	<i>Parámetros de Producción</i>					
		<i>Polvo producido (gr/kg sustrato)</i>	<i>N° Conidios /gr. Polvo</i>	<i>N° Conidios /gr. Polvo</i>	<i>N° conidios/g de Sustrato</i>		
3	Arroz quebrado	85,52	A	4,40E+10	A	3,72E+09	A
1	Arroz parbolizado (testigo)	57,85	B	3,63E+10	B	2,04E+09	B
2	Arroz blanco entero	44,39	B	3,33E+10	B	1,44E+09	B
5	Arroz Integral	43,07	C	2,07E+10	C	8,90E+08	C
4	Arroz cascara	16,29	D	3,70E+10	B	6,04E+08	C
6	Trigo desca scarado	8,63	D	1,07E+10	D	9,22E+07	D
7	Cascara de arroz	9,14	D	2,33E+09	D	2,11E+07	D
	<i>CV (%)</i>	12,94		26,06		31,04	
	<i>p-valor</i>	< 0,0001		0,0001		< 0,0001	

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente según Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

El hongo produjo conidios en todas las variantes, destacándose significativamente el tratamiento constituido a base de arroz blanco quebrado donde se obtuvo  $3,79 \times 10^9$  conidios/gr de sustrato ( $F= 33,34$ ;  $gl= 6, 12$ ;  $P < 0,05$ ),  $85,52$  gr de polvo de conidios/kg de sustrato ( $F= 101,92$ ;  $gl= 6, 12$ ;  $P < 0,05$ ) y  $4,4 \times 10^{10}$  conidios/gr de polvo de conidios ( $F= 15,17$ ;  $gl= 6, 12$ ;  $P < 0,05$ ). El arroz parbolizado, que fue utilizado como testigo, presentó menores valores que el arroz blanco quebrado, sin presentar diferencias estadísticas con el arroz blanco entero, pero sí con el resto de los sustratos utilizados (Tabla 13). Por otro lado, los tratamientos a base de trigo descascarado, arroz cáscara y cáscara de arroz difieren de los demás, alcanzando los menores valores de producción de conidios (Tabla 13).

Los sustratos cáscara de arroz y trigo descascarado tuvieron una reducción de aproximadamente dos órdenes de magnitud en el número de conidios en comparación con el testigo y un grado de reducción para los sustratos arroz cáscara y arroz integral (Tabla 13). Resultados similares fueron hallados por Rezende et al., (2011), donde el arroz parbolizado, el arroz blanco entero y el arroz integral produjeron  $4,38 \times 10^9$ ,  $2,68 \times 10^9$  y  $1,53 \times 10^9$  conidios/gr de sustrato, bajo condiciones similares de producción. Según Vilas Boas et al., (1996), el arroz fue el mejor tratamiento para la producción de *B. bassiana*, así mismo, Mendoça y Rocha (1992) verificaron que el arroz parbolizado fue el único sustrato donde la concentración alcanzó  $10^{10}$  conidios/g de arroz.

Neves et al., (2001b) evaluó la producción del hongo *B. bassiana* en seis diferentes tipos de arroz, utilizando diferentes metodologías de preparación y observó que el arroz cocido, integral y parbolizado fueron los más productivos. Ottati-de-Lima, (2007), también evaluó la producción de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en diferentes sustratos, verificando que el arroz tipo 2 (mayor cantidad de granos quebrados y presencia de granos manchados, panza blanca y yesosos) fue el más productivo y económico para la producción de *M. anisopliae*, en tanto para *B. bassiana* el arroz parbolizado fue el medio más apropiado.

Los hongos entomopatógenos desarrollados sobre arroz en bolsas plásticas bajo un sistema de producción artesanal han alcanzado rendimientos del orden de  $10^{10}$  conidios/gr de sustrato, aunque lo más frecuente, en la mayoría de las especies, son los valores de  $10^9$  conidios/gr de sustrato (Jenkins et al., 1998; Bhanu Prakash et al., 2008).

El arroz es el sustrato más utilizado para la producción masiva de hongos entomopatógenos por mantener las condiciones físicas, con una adecuada superficie



efectiva para el crecimiento micelial, un balance nutricional y condiciones específicas acordes a los requerimientos del aislamiento en cuanto a aireación y contenido de humedad (Bhanu Prakash et al., 2008; Sahayaraj y Karthick, 2008). Según Méndez et al., (2009) y Cherry et al., (1999) es fundamental la relación que existe entre el contenido de humedad y la disponibilidad de oxígeno, elemento que es indispensable en el caso de la esporulación de *M. anisopliae*, por lo que el contenido de humedad para lograr un buen rendimiento de conidios de los hongos mitospóricos debería estar entre un 35 y 60 %; en los medios utilizados se colocó una cantidad proporcional al 50 % del peso del sustrato.

Según Méndez et al., (2010), la evaluación de producción se realiza aproximadamente a los 12 días de inoculado, ya que a los seis días se observa que hay producción de conidios sobre el sustrato, comenzando la fase exponencial de crecimiento a los ocho y terminando a los 10-11 días, iniciando a los 12 días la fase de meseta donde se estabiliza la producción de conidios y no existen diferencias significativas con mayores días en el estado de producción. La superioridad de un medio como el arroz en el desarrollo de los hongos entomopatógenos en menor tiempo fue comprobada por diversos autores y este medio está siendo utilizado con éxito para el cultivo de hongos (Aquino, 1974; Marques y Villas Boas, 1973; Villacorta, 1977).

El porcentaje de germinación de conidios solamente se vio afectado significativamente ( $F= 101,92$ ;  $gl= 6, 12$ ;  $P < 0,05$ ) cuando se utilizó como sustrato cáscara de arroz y en menor medida cuando se uso trigo descascarado (Tabla 14). Datos similares se muestran por Ottati-de-Lima et al., (2010) donde el porcentaje de germinación de *M. anisopliae* no fue perjudicada por el cultivo del hongo en los diferentes sustratos, y a pesar de haber visto diferencia estadística entre algunos de los tratamientos, el porcentaje de germinación fue mayor al 94 %. En este trabajo se observó que con los sustratos a base de arroz, exceptuando la cáscara de arroz, los valores de germinación permanecieron por encima del 97 % de germinación de conidios.

**Tabla 14:** Porcentaje de germinación (%) de conidios de Ma 72 de *Metarhizium anisopliae* producidos sobre diferentes sustratos sólidos

<i>Trat.</i>	<i>Medios sólidos</i>	<i>Porcentaje de germinación (%)</i>	
3	Arroz blanco quebrado	98,31	A
1	Arroz parbolizado (testigo)	97,98	A
2	Arroz blanco entero	97,92	A
4	Arroz cáscara	97,84	A
5	Arroz Integral	97,69	A
6	Trigo descascarado	95,03	B
7	Cáscara de arroz	90,55	C
<i>CV (%)</i>		1,25	
<i>p-valor</i>		< 0,0001	

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente según Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Esta posibilidad de tener un sustrato de bajo costo, y un mayor rendimiento de producción frente a otros sustrato, facilita la acción de que este hongo sea producido en cantidades masivas y pueda ser incorporado y adaptado rápidamente dentro de un sistema de MIP.

#### **3.3.4 Selección de coadyuvantes de formulación según su compatibilidad con la cepa Ma 72 de *M. anisopliae***

Los resultados del ensayo de selección de coadyuvantes mostraron diferencias significativas en la germinación de conidios a las 24 hs ( $F= 8,68$ ;  $gl= 6, 18$ ;  $P < 0,05$ ) y 48 hs ( $F= 11,35$ ;  $gl= 6, 18$ ;  $P < 0,05$ ) de observación (Tabla 15).

El porcentaje de germinación de la cepa Ma 72 mezclada con los diferentes coadyuvantes mostró que solamente la mezcla con el Total I Corrector al 1,5 % v/v, fue significativamente inferior al testigo (Tween 5 % v/v), causando un efecto negativo en la germinación de los conidios a las 24 y 48 hs de observación en relación con el Testigo (Tween 5 % v/v). Los diferentes coadyuvantes al 5 % v/v (Oleo, Plurafac y Bayer Xtra) y al 10 % v/v (Plurafac y Bayer Xtra) no mostraron diferencias significativas a las 24 y 48 hs de observación con respecto al testigo. El Plurafac se mostró menos perjudicial para *M. anisopliae* que el Bayer Xtra y el Oleo a las 48 hs en ambas concentraciones evaluadas (5 % y 10 % v/v). Esto concuerda con los resultados expresados por Kassa, 2003, que menciona al Plurafac como beneficioso para una formulación de tipo Concentrado Emulsionable (CE), ya que produce una buena emulsión y es compatible con aceites, no afecta la viabilidad de esporas sumergidas de

*M. anisopliae* var. *acridum* (IMI 330189) y acelera el crecimiento miceliano de esta cepa.

**Tabla 15:** Germinación de conidios de Ma 72 de *Metarhizium anisopliae* mezclados con diferentes concentraciones de coadyuvantes de formulación

<i>Trat.</i>	<i>Coadyuvantes de formulación</i>	<i>Germinación 24 hs</i>		<i>Germinación 48 hs</i>	
1	Testigo (Tween 5% v/v)	86,34	A	85,05	A B
2	Plurafac 5 % v/v (BASF)	83,36	A	89,79	A
3	Plurafac 10 % v/v (BASF)	85,50	A	90,02	A
4	Bayer Xtra 5 % v/v	86,02	A	83,66	B C
5	Bayer Xtra 10 % v/v	84,63	A	84,06	B C
6	Total I Corrector 1,5 % v/v	77,62	B	78,83	C
7	Oleo 5 % v/v	81,73	A B	84,35	B
<i>CV(%)</i>		2,51		2,61	
<i>p-valor</i>		0,0002		< 0,0001	

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente según Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Exceptuando el Total I Corrector que afectó significativamente la germinación de los conidios de la cepa Ma 72 con respecto al testigo, los demás coadyuvantes no mostraron diferencias. Si hubo diferencia entre los coadyuvantes Bayer Xtra y Oleo con respecto al coadyuvante Plurafac en cuanto a la germinación de los conidios.

Estos resultados sugieren que los coadyuvantes Tween y Plurafac podrían ser utilizados para formular conidios de *M. anisopliae*.

### 3.3.5 Ensayos de diferentes formulaciones experimentales sobre la viabilidad en el almacenamiento de conidios de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae*

La viabilidad de los conidios de la cepa Ma 72 almacenados en ocho formulaciones diferentes, a dos temperaturas durante 100 días fue significativamente afectada por el tipo de Formulación ( $df = 7, 98, F = 146,98, P < 0,05$ ), Temperatura ( $df = 1, 98, F = 29832,32, P < 0,05$ ) y el Tiempo de almacenamiento ( $df = 1, 98, F = 629,51, P < 0,05$ ) (Tabla 16). También hubo interacciones significativas entre los factores principales Formulaciones x Temperatura ( $df = 7, 98, F = 99,16, P < 0,05$ ), Formulaciones x Tiempo de almacenamiento ( $df = 1, 98, F = 857,89, P < 0,05$ ), Temperatura x Tiempo de almacenamiento ( $df = 7, 98, F = 74,65, P < 0,05$ ) y Formulaciones x Temperatura x Tiempo de almacenamiento ( $df = 7, 98, F = 68,76, P < 0,05$ ) (Tabla 16).

**Tabla 16:** Viabilidad (%) de conidios de Ma 72 de *Metarhizium anisopliae* de las formulaciones en base a Polvo Mojable (PM) y Concentrado Emulsionable (CE) a diferentes temperaturas de almacenamiento, 24 horas después de la incubación a  $25 \pm 0,5$  °C. Viabilidad inicial: 97 %.

Trat.	Formulado	Almacenamiento	Viabilidad de conidios (%)			Pérdida Viabilidad de conidios (%)		
			50 días	100 días	100 días	50 días	100 días	100 días
1	PM: Testigo_ Conidios Ma.	6 °C	87,32	A	79,98	C D	9,68	17,02
13	CE: 15% Ma + 80% Oleo + 5% Bayer Xtra	6 °C	84,97	A B	85,11	A	12,03	11,89
15	CE: 15% Ma + 80% Oleo + 5% Tween 80	6 °C	83,76	A B	82,96	A B	13,24	14,04
9	CE: 15% Ma + 85% Oleo	6 °C	81,66	A B	80,97	B C	15,34	16,03
3	PM: 15% Ma + 85% Fecula Maiz	6 °C	80,85	A B	84,39	A	16,15	12,61
7	PM: 15% Ma + 85% Arroz molido	6 °C	78,12	B C	83,02	A B	18,88	13,98
5	PM: 15% Ma + 85% Talco mineral	6 °C	73,58	C D	77,77	D	23,42	19,23
11	CE: 15% Ma + 80% Oleo + 5% Plurafac	6 °C	70,76	D	79,52	C D	26,24	17,48
10	CE: 15% Ma + 85% Oleo	20 °C	51,42	E	7,44	F	45,58	89,56
8	PM: 15% Ma + 85% Arroz molido	20 °C	49,44	E	1,96	G	47,56	95,04
16	CE: 15% Ma + 80% Oleo + 5% Tween 80	20 °C	46,97	E	16,47	E	50,03	80,53
4	PM: 15% Ma + 85% Fecula Maiz	20 °C	16,22	F	5,57	F	80,78	91,43
2	PM: Testigo_ Conidios Ma.	20 °C	14,24	F G	2,37	G	82,76	94,63
14	CE: 15% Ma + 80% Oleo + 5% Bayer Xtra	20 °C	12,01	F G	4,63	F G	84,99	92,37
12	CE: 15% Ma + 80% Oleo + 5% Plurafac	20 °C	9,25	F G	2,31	G	87,75	94,69
6	PM: 15% Ma + 85% Talco mineral	20 °C	7,82	G	2,21	G	89,18	94,79
<b>CV (%)</b>			5,31	2,54				
<b>p-valor (Formulado*Almacenamiento)</b>			< 0,0001			< 0,0001		

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente según Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

La viabilidad de los conidios dentro de la misma formulación se redujo significativamente en el tiempo con respecto a su viabilidad inicial (97 % conidios germinados), a diferentes velocidades dependiendo de la composición de la formulación y de la temperatura de almacenamiento (Tabla 16). La viabilidad de los conidios a temperatura de refrigeración (6 °C) cayó por debajo del 87,32 % a los 50 días y del 85,11 % a los 100 días para todos los tratamientos. Sin embargo a temperatura ambiente (20 °C) la pérdida de viabilidad fue mayor, observándose que a los 50 días de almacenamiento todos los tratamientos estaban por debajo del 51,42% y a los 100 días por debajo de 16,47 % de germinación de los conidios. La pérdida de viabilidad a temperatura de refrigeración para el tratamiento testigo fue de 9,68 % a los 50 días y de 17,02 % a los 100 días (Tabla 16).

La viabilidad de los conidios en almacenamiento de mediano plazo fue mejor a 6 °C que a 20 °C para todas las formulaciones ensayadas. A los 50 días de almacenamiento y a 6 °C los formulados que mejor se comportaron fueron *PM: 15 % Ma + 85 % Fécula Maíz; CE: 15 % Ma + 85 % Oleo; CE: 15 % Ma + 80 % Oleo + 5 % Tween 80; CE: 15 % Ma + 80 % Oleo + 5 % Bayer Xtra* sin diferencias con el *PM: Testigo\_Conidios Ma 72*. Sin embargo, a los 50 días de almacenamiento y a 20 °C los que presentaron mayores porcentajes de viabilidad fueron *CE: 15 % Ma + 80 % Oleo + 5 % Tween 80; PM: 15 % Ma + 85 % Arroz molido* y *CE: 15 % Ma + 85 % Oleo*, sin observarse diferencias entre sí.

A los 100 días de almacenamiento, los formulados que fueron conservados a temperatura ambiente (20 °C), disminuyeron su viabilidad a valores muy bajos (< 16,47 %). Sin embargo, bajo condiciones de refrigeración (6 °C) tuvieron valores similares de viabilidad que a 50 días de evaluado. Alves et al., (2002) mencionaron que la pérdida de la viabilidad se reduciría con una mayor extracción de la humedad, a valores de entre 4 y 5 %, por medio de la adición de perlitas secas de sílica gel, que absorberían una pequeña cantidad de humedad. Según McClatchie et al., (1994) los conidios almacenados por debajo de esta humedad mejoran en gran medida su tolerancia a la alta temperatura. El secado de los conidios, su contenido final de humedad y la temperatura de almacenamiento son factores importantes en la longevidad de conidios (Hong et al., 1997).

Entre los formulados almacenados a temperatura de refrigeración se encuentran dos formulados en Polvo Mojable: *PM: 15 % Ma + 85 % Fécula Maíz* y *PM: 15 % Ma + 85 % Arroz molido* y dos Concentrados Emulsionables: *CE: 15 % Ma + 80 % Oleo +*

5 % Tween 80 y CE: 15 % Ma + 80 % Oleo + 5 % Bayer Xtra. El agente humectante Tween 80 se ha usado en bioensayos de laboratorio para facilitar la suspensión de conidios hidrófobos (Marques et al., 1981; Alves, 1986; Prior y Jollands, 1988). Resultados muy prometedores se han obtenido con base de aceite que contienen adyuvantes emulsionantes no-iónicos (Alves et al., 1998c). Estos adyuvantes (Tween 80 y Bayer Xtra) son capaces de formar una emulsión estable de aceite en agua, proporcionando así una base para la dispersión del ingrediente activo en la suspensión (Field y Dastgheib, 1996). Todos estos formulados presentan una buena solubilidad en agua, por lo que se podrían utilizar sin problemas con pulverizadores hidráulicos convencionales en el cultivo del arroz.

El potencial para el desarrollo de micoinsecticidas ha sido impulsado por el descubrimiento de que los conidios de hongos formulados en aceites han demostrado mayor infectividad que los convencionales en base a suspensiones de agua. Los aceites pueden mejorar sustancialmente la eficacia de entomopatógenos contra insectos (Prior y Jollands, 1988). Burges y Jones (1998) detalla que las formulaciones en aceite, son no- evaporativas, son compatibles con aplicaciones de ultra bajo volumen (UBV) y aplicaciones con bajas humedades relativas (Bateman, 1997).

Actualmente, siguen siendo preferidos para la comercialización de estos hongos como material seco, por su importancia en cuanto al peso y la manipulación de estos productos durante la comercialización. Según Faria y Wraight (2007), las esporas asexuales, conidios aéreos, es la forma actualmente más usada que forma parte de los formulados, y de un estudio de mercado resultó que los tipos más comunes fueron los llamados concentrados técnicos (hongos sobre el sustrato) (26,3 %), polvos humectables (20,5 %), y dispersiones en aceite (15,2 %). Los restantes tipos incluyen gránulos (2,9 %), los materiales técnicos (2,9 %), cebos (1,8 %), gránulos dispersables en agua (1,8 %), concentrados en aceite miscible (1,2 %), suspensiones UBV (0,6 %), suspensiones concentradas (0,6 %), y polvos de contacto (0,6 %).

Los resultados del presente trabajo muestran que las formulaciones de aceite emulsionantes de *M. anisopliae* con coadyuvante pueden utilizarse para formular y almacenar conidios a medio plazo en condiciones refrigeradas.

### 3.3.6 Evaluación en condiciones controladas de la eficacia de los micoinsecticidas seleccionados en invernáculo sobre *T. limbativentris*

Los resultados obtenidos en este experimento mostraron la ocurrencia de mortalidad con todos los formulados evaluados, pero existió variación en relación con la eficiencia (Tabla 17).

**Tabla 17:** Mortalidad confirmada (%) de *Tibraca limbativentris* por la cepa Ma 72 de *Metarhizium anisopliae*, bajo condiciones de invernáculo en la EEA Corrientes – INTA.

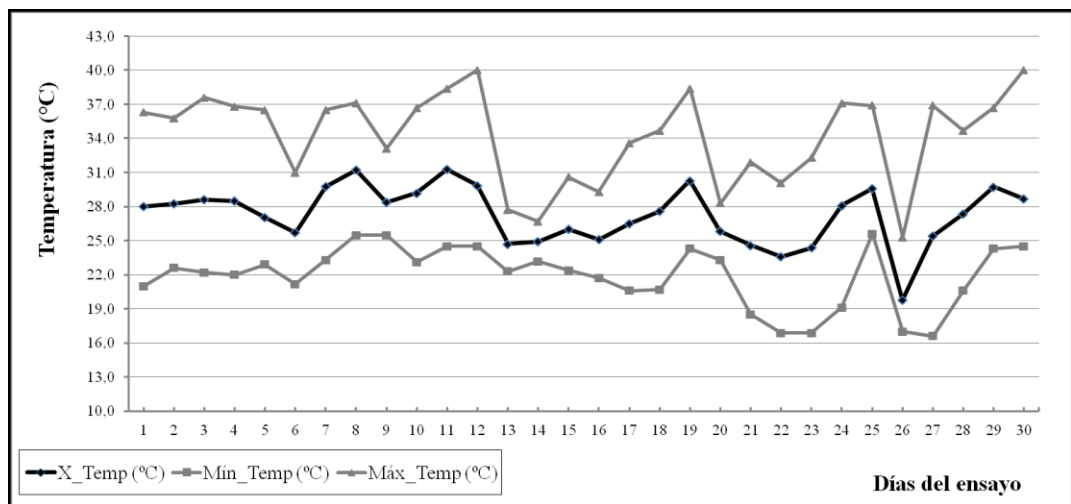
Trat.	Producto aplicado	Porcentaje de Mortalidad Confirmada (%)				
		15 días	20 días	25 días	30 días	
3	PM: 15% Ma 72 + 85% Arroz molido	43,3 ± 5,18	A 56,6 ± 4,19	A 70,0 ± 2,89	A 73,3 ± 3,33	A B
4	CE: 15% Ma 72 + 80% Oleo + 5% Bayer Xtra	50,0 ± 5,18	A 56,6 ± 4,19	A 70,0 ± 2,89	A 76,6 ± 3,33	A
2	PM: 100% Conidios Puros Ma 72	40,0 ± 5,18	A 53,3 ± 4,19	A 60,0 ± 2,89	A 60,0 ± 2,33	B C
5	CE: 15% Ma 72 + 80% Oleo + 5% Tween 80%	36,6 ± 5,18	A 53,3 ± 4,19	A 56,6 ± 2,89	A 56,6 ± 3,33	C
1	Testigo (sin aplicación)	-	-	-	-	-
	CV (%)	21,12	13,21	7,79	8,29	
	p-valor	0,3848	0,8856	0,0348	0,0109	

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente según Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

No se presentaron diferencias significativas a los 15 días ( $F= 1,21$ ;  $gl= 3, 6$ ;  $P < 0,05$ ), 20 días ( $F= 0,21$ ;  $gl= 3, 6$ ;  $P < 0,05$ ) y 25 días ( $F= 5,67$ ;  $gl= 3, 6$ ;  $P < 0,05$ ). Sin embargo, a los 30 días después de la aplicación de los hongos se observaron diferencias significativas ( $F= 9,45$ ;  $gl= 3, 6$ ;  $P < 0,05$ ), en cuanto a la mortalidad confirmada de adultos de *T. limbativentris*, bajo condiciones de invernáculo. Por lo que se confirmaron los resultados obtenidos con esta cepa Ma 72 en condiciones de laboratorio.

No ocurrió mortalidad de los insectos en el tratamiento *Testigo (sin aplicación)*; por el contrario, la mortalidad en los demás tratamientos, fue variable según el tratamiento.

En las Fig. 29, 30 y 31 se pueden observar las condiciones ambientales presentes durante el periodo en el cual se llevó adelante el ensayo de eficacia. En la Fig. 29 se pueden observar la temperatura media, mínima y máxima diaria, con un promedio durante el periodo de  $27,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , una mínima promedio de  $19,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una máxima promedio de  $31,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esta temperatura media, se encuentra dentro del intervalo óptimo para el desarrollo del hongo ( $25^{\circ}\text{C}$  y  $30^{\circ}\text{C}$ ), aunque se registraron muchos picos de máximas por encima de los  $30^{\circ}\text{C}$ .

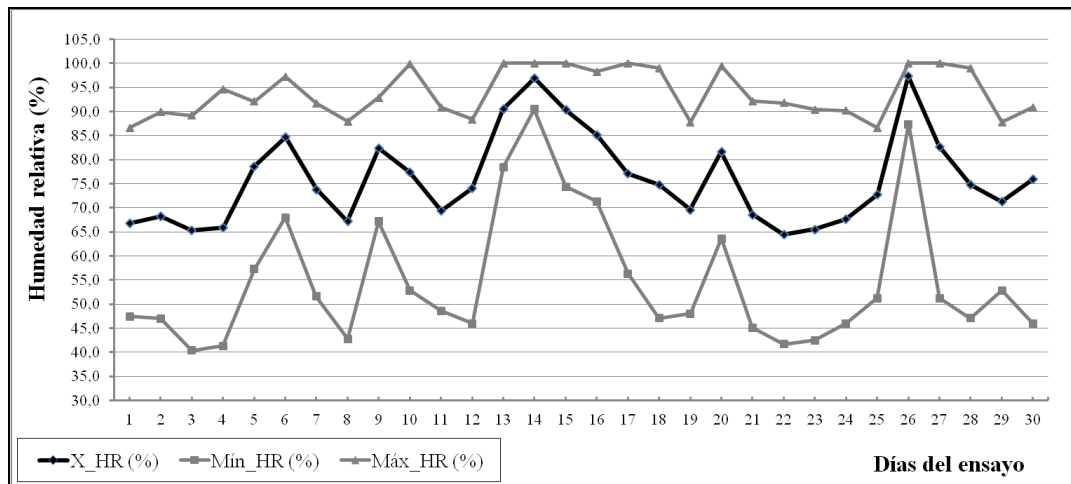


**Fig. 29:** Temperatura media, máxima y mínima diaria ( $^{\circ}\text{C}$ ) durante los días en los cuales se mantuvo el ensayo de eficacia en condiciones de invernáculo en la EEA Corrientes – INTA, 2013.

En la Fig. 30 se muestran los promedios durante el período de la humedad relativa ( $77,1\%$ ), humedad mínima ( $64,5\%$ ) y la humedad máxima ( $97,5\%$ ), observándose que la humedad dentro de las parcelas se mantuvo por encima del  $60\%$ , y

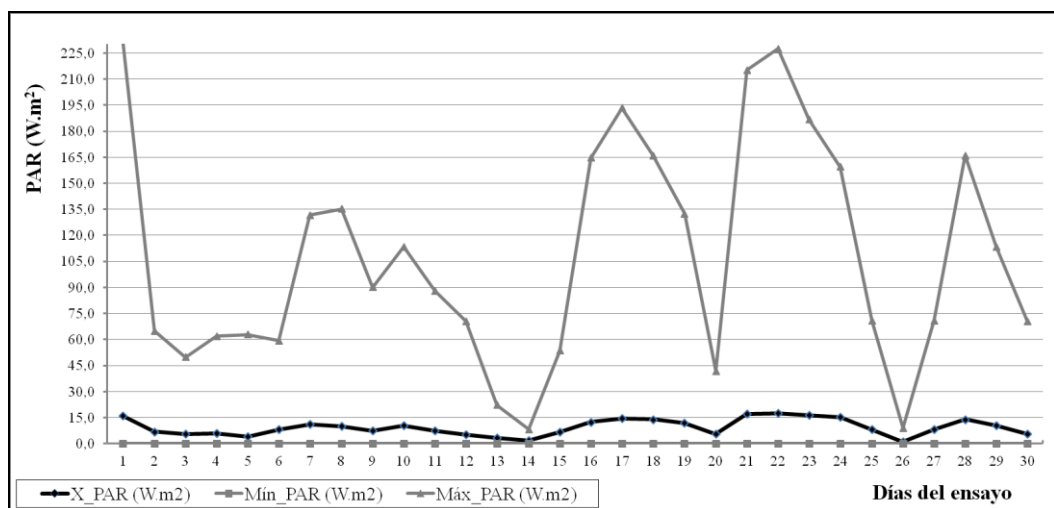


la superficie del suelo siempre se mantuvo en condiciones saturadas. Según Martins et al., (1986), la humedad es el factor más favorable para el crecimiento del hongo.



**Fig. 30:** Humedad Relativa media, máxima y mínima diaria (%) durante los días en los cuales se mantuvo el ensayo de eficacia en condiciones de invernáculo en la EEA Corrientes – INTA, 2013.

Finalmente en la Fig. 31 se observa la Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR) en la cual se obtuvo un promedio durante el período del ensayo de  $9,38 \text{ W.m}^2$ . Estas condiciones micro-climáticas presentes durante el período de desarrollo del ensayo, muestran la variabilidad en cuanto a los parámetros observados, y posiblemente estos factores climáticos hayan interferido en el desempeño de estos hongos. Según Alves, (1986), la temperatura y la humedad ambiental son los factores relevantes en el desarrollo del ciclo de las relaciones parasito/hospedero, influenciando en la germinación de los conidios, el desarrollo del tubo germinativo y en la penetración del hongo al hospedero.



**Fig. 31:** Radiación fotosintéticamente activa (PAR) media, máxima y mínima diaria (W.m<sup>2</sup>) durante los días en los cuales se mantuvo el ensayo de eficacia en condiciones de invernáculo en la EEA Corrientes – INTA, 2013.

Durante los primeros 25 días no se observaron diferencias entre los diversos formulados y el testigo aplicado como conidios puros (*PM: Testigo\_Conidios Ma*). Pero los tratamientos *PM: 15 % Ma + 85 % Arroz molido* y *CE: 15 % Ma + 80 % Oleo + 5 % Bayer Xtra* presentaron las medias más altas de mortalidad confirmada frente a los otros tratamientos. Recién a los 30 días de aplicación de la cepa Ma 72 se observaron diferencias, siendo el tratamiento *CE: 15 % Ma + 80 % Oleo + 5 % Bayer Xtra* quien proporcione un 76,66 % de mortalidad confirmada, seguido del tratamiento *PM: 15 % Ma + 85 % Arroz molido* con un 73,33 %. El tratamiento *CE: 15 % Ma + 80 % Oleo + 5 % Tween 80 %*, no se diferenció del tratamiento *PM: Testigo\_Conidios Ma* (56,66 % vs 60 %). La eficiencia de la cepa de *M. anisopliae* fue dependiente del tipo de formulado y estuvo favorecida su acción cuando estaba formulada como *CE: 15 % Ma + 80 % Oleo + 5 % Bayer Xtra* y *PM: 15 % Ma + 85 % Arroz molido*. Los formulados con presencia de coadyuvantes, pueden haber aumentado la adhesión, germinación y el efecto fungistático de los conidios de *M. anisopliae* sobre *T. limbativentris*.

Los resultados preliminares obtenidos en laboratorio (Kruger et al., 2012a) difieren de los logrados en condiciones de campo. Esta menor efectividad de la cepa de *M. anisopliae* sobre la chinche *T. limbativentris*, probablemente se debió a la técnica de aplicación del hongo (aspersión), al excesivo follaje que presentó el cultivo del arroz (lo que dificulta, por la ubicación de la chinche, la llegada de conidios sobre la superficie del este insecto) y a una menor concentración de conidios utilizados ( $3,33 \times 10^7$  conidios/ml, equivalente a  $2 \times 10^{12}$  conidios/ha), ya que en condiciones de laboratorio, el bioensayo se realizó por inmersión de los insectos en una suspensión de  $5 \times 10^8$  conidios/ml. Además, los valores obtenidos de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> de Ma 72 fueron de  $1,81 \times 10^7$  y  $1,44 \times 10^8$  conidios/ml, respectivamente. Por lo que se concluye que la aplicación de esta cepa debería haber estado por encima del valor aplicado, es decir, entre  $5 \times 10^{12}$  y  $1 \times 10^{13}$  conidios/ha. Martins et al., (1986) observaron en condiciones confinadas de jaulas, que la mortalidad del hongo fue media (> que 50 %), para una concentración de  $5 \times 10^{13}$  esporas/ha y baja (< que 30%), para una concentración de  $1 \times 10^{13}$  esporas/ha. Martins et al., (2004b), llevaron a cabo tres experimentos en Rosario do sul-RS- Brasil, durante 3 campañas (1991, 1993 y 1994), evaluando la eficiencia de *M. anisopliae* en el control de *T. limbativentris*, donde observaron que la eficiencia del

insecticida Monocrotofós, como testigo químico, fue del 80,3 %, 84,3 % y de 77,1 %, respectivamente a los 15 días de aplicado. Mientras que una pulverización con una suspensión de  $7,2 \times 10^{13}$  conidios/ha de la cepa Ma 72 provocó un control del 61,8 % a los 45 días de aplicado en el experimento 1, un 48,2 % y 39,5 % a los 15 días de aplicado en el experimento 2 y 3, respectivamente, pero de estos últimos sólo se confirmaron la mortalidad por micosis el 20 % y el 9,8 %. Según Silva y Veiga (1998), un entomopatógeno es considerado eficaz cuando presenta una mortalidad superior al 40 % para la plaga estudiada. En nuestro ensayo el control logrado está dentro de parámetros de control biológico, concordando con resultados de diversos autores.

El tiempo medio de supervivencia ( $ST_{50}$ ) de adultos de la chinche del tallo, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ( $F= 123,57$ ;  $gl= 4, 8$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabla 18).

**Tabla 18:** Supervivencia media (días) de *Tibraca limbativentris* después de aplicado la cepa Ma 72 de *Metarhizium anisopliae*, bajo condiciones de invernáculo en la EEA Corrientes – INTA

<i>Trat.</i>	<i>Producto aplicado</i>	<i>Tiempo medio de supervivencia (<math>ST_{50}</math>) (días)</i>	
4	CE: 15% <i>Ma 72</i> + 80% Oleo + 5% Bayer Xtra	13,17 ± 1,76	sd
3	PM: 15% <i>Ma 72</i> + 85% Arroz molido	15,67 ± 1,76	sd
2	PM: 100% Conidios Puros <i>Ma 72</i>	17,00 ± 1,76	sd
5	CE: 15% <i>Ma 72</i> + 80% Oleo + 5% Tween 80%	18,18 ± 1,76	sd
1	Testigo (sin aplicación)	-	
<i>CV (%)</i>		19,01	
<i>p-valor</i>		0,3082	

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente según Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Los índices de control para los diversos formulados del hongo, en el ensayo, fueron buenos, principalmente por tratarse de control biológico. Los mejores resultados fueron observados con el tratamiento *CE: 15 % Ma + 80 % Oleo + 5 % Bayer Xtra* luego de 30 días de la aplicación.

La aplicación de hongos entomopatógenos sobre individuos de *T. limbativentris*, se vuelve factible debido a la localización del insecto en lugares de alta humedad, siendo posible lograr un control satisfactorio ( $56,66 \% \leq \text{Mortalidad} \leq 76,66 \%$ ) a los 30 días dependiendo del tratamiento.

## CAPITULO 4

### 4.1 DISCUSION GENERAL

La chinche grande del arroz, *T. limbativentris*, se ha convertido en una plaga importante en la provincia de Corrientes a partir de la introducción de los sistemas de siembra directa y de monocultivo de arroz, esta disminución en el laboreo del suelo y la acumulación de un alto volumen de rastrojo contribuyen a mantener la humedad del suelo, lo que ha favorecido a que este insecto permanezca dentro de los lotes o migre hacia lotes o borduras cercanos al mismo. Esto consecuentemente ha producido un aumento del número de aplicaciones de insecticidas desde las fases iniciales del cultivo (Kruger et al, 2013).

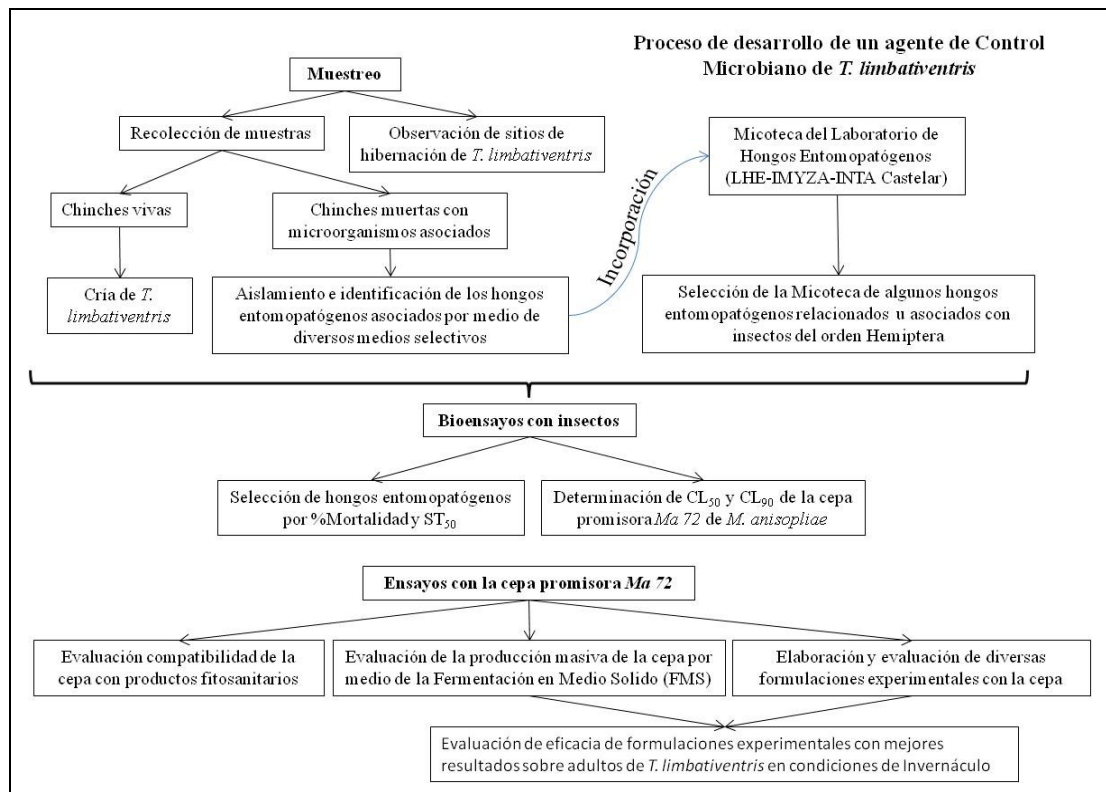
El control microbiano ha sido recientemente reconocido como un importante componente dentro de las estrategias del MIP de cultivos a campo. El éxito del desarrollo de un futuro micoinsecticida depende de la disponibilidad de las cepas promisoras, de sistemas óptimos y económicos de producción de las mismas, de las formulaciones posibles para mantener la viabilidad de los conidios por un mayor lapso de tiempo y finalmente de la facilidad con que estos productos puedan ser adquiridos y usados por los productores, sin demandarle elevados costos y uso de maquinarias y/o técnicas de difícil adquisición para los mismos.

En la Fig. 32 se observa las etapas llevadas a cabo para el desarrollo de un agente de control microbiano para *T. limbativentris*.

En la primer etapa de muestreo se pudo evaluar la presencia de hongos entomopatógenos asociados a la chinche del tallo, en especial, *M. anisopliae* sobre adultos de *T. limbativentris*, en varios campos arroceros de la provincia durante el período de post-cosecha de arroz, lo que incentiva al uso de estos agentes de control microbiano en las áreas infestadas por esta plaga. En total se lograron aislar e identificar 11 cepas de hongos entomopatógenos que fueron incorporados a la Micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del IMYZA – INTA Castelar. Además, se observó que durante el muestreo invernal *T. limbativentris* permanece en estado adulto y que los sitios de hibernación se encuentran dentro de los campos de arroz y/o próximos a los mismos, debajo del rastrojo o de abundante vegetación, preferencialmente en especies de la familia Poaceae.

En la segunda etapa por medio de bioensayos llevados a cabo con cepas de la micoteca y aislamientos obtenidos de adultos de *T. limbativentris* se seleccionó la cepa

promisora de hongo entomopatógeno por su patogenicidad sobre adultos de *T. limbativentris*, pudiendo evaluar con la misma su Tiempo de Supervivencia Media ( $ST_{50}$ ) y la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) sobre adultos de *T. limbativentris* (Fig. 32).



**Fig. 32:** Secuencia de etapas llevadas a cabo para la búsqueda, aislamiento y selección de hongos entomopatógenos para el control microbiano de *Tibraca limbativentris*

En una tercer etapa varios ensayos fueron llevados a cabo solamente con la cepa promisoría Ma 72 de *M. anisopliae* (Fig. 32). El primero fue la evaluación de la compatibilidad de esta cepa con diversos productos fitosanitarios usados en el cultivo del arroz, que permitieron observar diversos efectos, entre ellos algunos compatibles y otros que causaron algún efecto a la cepa. Posteriormente, se logró producir conidios de la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* sobre diversos sustratos por medio de la Fermentación en Medio Sólido (FMS). Finalmente, con los conidios obtenidos se desarrollaron varias formulaciones experimentales, llamados micoinsecticidas, con el objetivo de buscar un producto con menor pérdida de viabilidad de conidios durante el almacenamiento y momento de aplicación.

En una última etapa, se evaluó la eficacia de tres micoinsecticidas, que mantuvieron la viabilidad de los conidios por mayor tiempo de almacenamiento, sobre adultos de *T. limbativentris* bajo condiciones de invernáculo.

La cepa Ma 72 de *M. anisopliae* se presenta como promisorio para la reducción poblacional de adultos de *T. limbativentris* y podría ser utilizada como táctica de control microbiano en programas de MIP frente a esta chinche, disminuyendo los perjuicios causados por la misma, así como los derivados del uso de productos fitosanitarios.

Esta táctica de control es una alternativa que puede ser fácilmente adoptada por los productores arroceros, debido a que utiliza el mismo equipamiento convencional para aplicación de los productos fitosanitarios sin provocarles grandes cambios en su sistema, siendo una ventaja para lograr una transferencia y un cambio adaptativo más fácil y rápido. El uso de micoinsecticidas ayudará a prevenir o reducir los perjuicios provocados por el mal uso de agroquímicos, tanto en lo que respecta a la preservación específica del ambiente (fauna, contaminación de agua y suelo) como los efectos sobre la salud de los trabajadores, comunidades rurales y/o consumidores. Esto a futuro contribuirá a la sustentabilidad de las producciones arroceras nacionales y en particular de la provincia de Corrientes.

Dentro de la tesis, no pudimos abarcar determinaciones de daño de esta plaga con aplicaciones de micoinsecticidas, debido a que solamente se estudió la eficacia de los micoinsecticidas sobre la plaga. Cabe resaltar que se deben manejar valores diferentes de umbral de daño para esta especie plaga, debido a que al ser un producto biológico, su acción es más lenta que cualquier insecticida sintético, y además depende de las condiciones climáticas favorables para su desarrollo. Tampoco se llevaron a cabo ensayos con 2 a 3 aplicaciones del hongo, con lo cual, posiblemente se obtendrían mejores índices de control de la plaga. No se realizaron ninguna evaluación del costo del producto, investigación de mercado, comercialización y posible distribución del agente biológico, que queda abierto a futuras tesis y/o proyectos.

## 4.2 CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo y bajo las condiciones sobre las cuales fueron realizados los experimentos, fue posible corroborar las hipótesis planteadas.

Con respecto a la hipótesis 1, se logró encontrar hongos entomopatógenos nativos asociados a la chinche del tallo *T. limbativentris* en la región arrocerá de la Provincia de Corrientes por medio del muestreo realizado durante la época invernal y se lograron aislar 11 cepas de hongos entomopatógenos, 3 de *B. bassiana*, 5 de *M. anisopliae* y 3 de *P. lilacinus*.

Para la hipótesis 2, se esperaba que algunos aislamientos de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sean efectivos y puedan ser utilizados para el control microbiano de *T. limbativentris*. En este sentido, los resultados demostraron que de los diversos aislamientos evaluados se lograron seleccionar dos cepas promisoras autóctonas de *M. anisopliae* (cepas Ma 72 y Ma 74) que son efectivas y pueden ser utilizados para el control de esta chinche, siendo seleccionada la cepa Ma 72 la de mayor virulencia. Además se pudo producir la cepa Ma 72 seleccionada de forma masiva sobre arroz quebrado y parbolizado, en condiciones de fermentación en medio sólido. Debido al menor precio y amplia disponibilidad en la región, el arroz quebrado resultaría la mejor alternativa. Finalmente la cepa Ma 72 de *M. anisopliae* en formulación presentó un control satisfactorio sobre adultos de *T. limbativentris* bajo condiciones de invernáculo.

Este trabajo pudo demostrar la hipótesis 3, que sería posible la utilización de la cepa Ma 72 con algunos productos fitosanitarios usados frecuentemente en el cultivo del arroz, ya que varios fueron compatibles, lo que resulta una buena estrategia para programas de MIP en arroz.

### 4.3 NUEVAS LINEAS DE INVESTIGACION

A futuro se buscará incluir a estos microorganismos ya seleccionados como parte de un programa de Manejo Integrado de Plagas para el cultivo del arroz en proyectos de la EEA-INTA Corrientes.

Se realizarán ensayos a campo para evaluar la eficacia de estos micoinsecticidas para el control de *T. limbativentris*.

Se estimarán nuevos umbrales de acción para *T. limbativentris* para el uso de estos productos biológicos.

Se evaluará la eficacia de la cepa Ma 72 y de otros hongos entomopatógenos para el control de otras plagas presentes en el cultivo del arroz.



## BIBLIOGRAFIA

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Economics Entomol.* Pp. 18: 265-267.

Al-Aidroos, K. y Roberts, D.W. 1978. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increase virulence towards mosquito larvae. *Canadian J. Gen. and Cytol.* Pp. 20: 211-219.

Alves, S.B., 1986. Agentes entomopatogênicos no controle microbiano. Pp. 73-126 en Alves, S.B. (Coord.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Manole.

Alves, S.B. 1998a. Controle microbiano de insetos. 2 ed., FEALQ: Piracicaba. 1163p

Alves, S.B.; Moino Jr., A.; Almeida, J.E.M. 1998b. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. Pp. 217-238 en Alves, S.B. (Coord.). Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ.

Alves, S.B.; Lopes, R.B.; Vieira, S.A.; Tamai, M.A. 2008. Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América latina. Pp.69-110 en Alves, S.B. y Lopes, R.B. Controle microbiano de pragas na América Latina. Piracicaba, Fealq, 414p.

Alves, R.T.; Bateman, R.P.; Prior, C. 1998c. Performance of *Metarhizium anisopliae* formulations with oil adjuvants on *Tenebrio molitor*. Pp. 170-175 en International Symposium on adjuvants for Agrochemicals, 5. Memphis. Proceedings.

Alves, R.T.; Bateman, R.P.; Gunn, J.; Prior, C.; Leather, S.R. 2002. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Neotr. Entomol.* 31: 91-99.

Aner, U. y Becker, M. 1993. Pentatomídeos em hibernação em touceiras de gramíneas no município de Eldorado do Sul, RS (Heteroptera: Pentatomidae). Pp. 36 en Congresso Brasileiro de Entomologia, 14. 1993. Piracicaba, Resumos. Piracicaba: Sociedade Entomológica do Brasil.

Aquino, M.L.N. 1974. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, no Estado de Pernambuco. *Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas, Recife.* 72: 1-26.

Bahiense, T.C.; Fernandes, E.K.K.; Bittencourt, V.R.E. 2006. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Vet. Parasitol.* 141: 319-324.

Bambaradeniya, C.N.B. y Amerasinghe, F.P. 2003. Biodiversity associated with the rice field agro-ecosystem in Asian countries: a brief review. Pp. 24 en International Water Management Institute: Working paper 63.

Barbosa, R.; Kassab, S.; Da Fonseca, P.; Rossoni, C.; Silva, A. 2011. Associação de *Metarhizium anisopliae* (Hyp.: Clavicipitaceae) com thiamethoxam para o controle da cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar. Ensaios e Ciência, Campo Grande. 15: 41-51.

Bateman, R.P., 1997. The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. Outlook on Agriculture 26: 13–18.

Batista Filho, A.; Alves, S.B.; Alves, L.F.A.; Pereira, R.M. y Augusto, N.T. 1998. Formulção de entomopatógenos. Pp. 917-967 en Alves, S.B. Ed. Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Brasil, FEALQ.

Batista Filho, A.; Almeida, J.E.M.; Lamas, C. 2001. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. Neotropical Entomology. 30: 437-447.

Baverstock, J.; Roy, H.E.; Clark, S.J.; Pell, J.K. 2006. Effect of fungal infection on the reproductive potential of aphids and their progeny. Journal of invertebrate pathology, 91(2): 136-139.

Bhanu Prakash, G.V.S.; Padmaja, V.; Siva Kiran, R.R. 2008. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae*. Bioresource Technology. 99(6):1530-1537.

Birch, A.N.E., Begg, G.S.; Squire, G.R. 2011. How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems. Journal of Experimental Botany. 62(10) 3251–3261.

Bittencourt, V.R., E. J. Souza, S. L. F. S. Peralva, A. G. Mascarenhas e S. B. Alves. 1997. Ação in vitro de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre algumas características biológicas de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em laboratório. Ver. Univ. Rural, Série Ciência da Vida 19: 65-71.

Blanford, S. y Thomas, M.B. 2001. Adult survival, maturation and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregária* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. J. Invertebr. Pathol. 78: 1-8.

Botton, M.; Martins, J.F.S.; Loeck, A.E.; Rosenthal, M.A. 1996. Biology of *Tibraca limbativentris* Stal on rice plants. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Porto Alegre. 25(1): 21-26.

- Boucias, D.G. y Latgé, J.P. 1988. Nonspecific induction of germination of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* host and non host cuticle extracts. J. Invertebr. Pathol. 51: 168-171.
- Burges, H.D. y Jones, K.A. 1998. Introduction. Pp. 2-30 en Burges, H.D. (Ed.). Formulation of Microbial Pesticides-Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Bustillo, A.E.; Obando, J.A.; Matabanchoy, J.A. y Castro, U. 2011. Control biológico del salivazo *Aeneolamia varia* (F.) (Hemiptera: Cercopidae). Uso del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Cali, Cenicaña. 12 p. (Serie Divulgativa No. 12).
- Butt, T.M. 1990. Fungal infection processes. A minireview. Pp. 121-124 en Annual meeting of the SIP, 23th and International Colloquium on invertebrate pathology and microbial control, 5 th. Adelaide, Australia.
- Butt T.M.; Ibrahim, L.; Ball, B.V.; Clark, S.J. 1994. Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. Pest Manag Sci. 4: 207-214.
- Camargo L.M.F. 2000. Efectividad biológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (Metsch) para el control del gorgojo del frijol, *Acanthoscelides obtectus* (Say). Tesis Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Instituto de enseñanza e investigación en Ciencias agrícolas. Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 63 p.
- Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogen. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p 199.
- Campos, L.A. 1982. Pragas do arroz no Acre e métodos de controle. Brasília: Embrapa-DID, 47 p. (Embrapa-UEPAE de Rio Branco. Circular Técnica 6).
- Carballo, M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. Rev. Manejo integrado de Plagas. 47: 1-4.
- Carbonell, R.M.; Costa, G.E.; Chávez, S.M. 1980. Efectividad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. en el control del *Lissorhoptrus brevirostris* (Suffr.) (Coleoptera: Curculionidae). Centro Agrícola. 7(1): 107-121.
- Casco, J.F.; Goldfarb, M.C.; Giménez, L.I. 2001. Botanal Sombrerito una herramienta computacional para estimar los atributos del recurso forrajero. Pp. 83 en Congreso Nacional sobre manejo de pastizales naturales. San Cristóbal. Santa Fe.

- Castiglioni, E.; Giani, G.; Binnewies, C.; Bentancur, O. 2008. Susceptibilidad de la chinche *Piezodorus guildinii* Westwood (Hemiptera: Pentatomidae) al insecticida Endosulfán. *Agrociencia* (2008) Vol XII N° 1 pág. 31 - 34 31
- Chandler, D.; Davidson, G.; Pell, J.K.; Ball, B.V.; Shaw, K.E.; Sunderland, K.D. 2000. Fungal biocontrol of Acari. *Biocontr. Sci. Technol.* 10: 357-384.
- Charnley, A.K. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi a speculative review. Pp. 229-270 en *Invertebrate-Microbial Interactions*. British Mycological Society Symposium 6.
- Cheaney, R.L. y Jennings, P.R. 1975. Problemas en cultivos de arroz en América Latina. Cali, Colombia: CIAT. 92p.
- Cherry, A.J.; Jenkins, N.E.; Hevief, G.; Bateman, R.; Lomer, C.J. 1999. Operational and Economic Analysis of a West African Pilot-scale Production Plant for Aerial Conidia of *Metarhizium* spp. for Use as a Mycoinsecticide Against Locusts and Grasshoppers. *Biocontrol Sci Technol.* 9:35-51.
- Cheung, P.Y.K. y Guala, E.A. 1982. In vivo events associated with entomopathology of *Beauveria bassiana* for the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.* 39: 303-313.
- Costa, E.C. y Link, D. 1992. Avaliação de danos de *Tibraca limbativentris* Stal., 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) em arroz irrigado. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil.* 21(1): 187-195.
- Costa, E.C. y Link, D. 1999. Efeito de inseticidas sobre predadores em arroz irrigado. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia.* 6: 24-31.
- Costa, E.C.; Guedes, J.V.C.; Franca, J.A.S.; Farias, J.R. 2006. Eficiência de neonicotinóides no controle de larvas de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) em arroz irrigado via tratamento de sementes. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia.* 13: 123-131.
- Costa Lima, A. da. 1940. Insetos do Brasil: Hemipteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. 2t. 351 p. (Série didática 3).
- Crisan, E.V. 1973. Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi. *Mycologia.* 65: 1171–1198.
- Delmas, J.C. 1988. Adaptation parasitaire de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown et Smith á l'insecte *Pieris brassicae* L. (Lep. Pieridae) et consequences hématologiques de l'infection. Thèse doctorat d'état. Paris. Université Paris VII, UER Biologie et Sciences de la nature. p 233.

Doberski, J.W. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: effect of temperatura and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. J. Invertebr. Pathol. 37: 195-200.

Dos Santos, L.M.P. 2008. Efeitos dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) e compatibilidade com inseticidas. Teses e Dissertações. Programas de Pós-graduação da CAPES. UFRPE/Entomología agrícola.

Empresa Brasileira de investigación Agropecuária (Embrapa). 2008. Informações Técnicas para a Cultura do Arroz Irrigado no Estado do Tocantins: Safra 2008/2009 ISSN 1678-9644.

Espinel, C.; Torres, L.; Grijalba, E.; Villamizar, L.; Cotes, A.M. 2008. Preformulados para control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en condiciones de laboratorio. Rev. Colombiana Entomol. 34 (1): 351-360.

Fargues, J.; Goettel, M.S.; Smits, N.; Ouedraogo, A.; Vidal, C.; Lacey, L.A.; Lomer, C.J.; Rougier, M. 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. Mycopathol. 135: 171-181.

Fargues, J.; Rougier, M.; Goujet, R.; Smits, N.; Coustere, C.; Itier, B. 1997. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. J. Invertebr. Pathol. 69: 70-78.

Fargues, J. y Luz, C. 1998. Effects of fluctuating moisture and temperatura regimens on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. Biocontrol Sc. Technol. 8: 323-334.

Faria de, M.R. y Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control. 43: 237-256.

Ferreira, E. y Martins, J.F. da S. 1984. Insetos prejudiciais ao arroz no Brasil e seu controle. Goiânia: Embrapa-CNPAP. Documentos 11. 67p.

Ferreira, E.; Martins, J.F.S.; Rangel, P.H.N.; Curtin, V.A. 1986. Resistência de arroz ao percevejo-do-colmo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília. 21 (5): 565-569.

Ferreira, E. 1995. Pragas do arroz: diagnostico e controle. Informacoes Agronomicas, Piracicaba. 9: 8-16.

Ferreira, E.; Zimmermann, F.J.P.; Santos, A.B.; Neves, B.P. 1997. O percevejo-do-colmo na cultura do arroz. Goiânia: Embrapa-CNPAP. Documento 75. 43p.

Ferron, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metharhizium*. Pp. 67-78 en Burges, H.D. Ed. Microbial control of pest and plant diseases. London, Academic press.

Field, R.J. y Dastgheib, F. 1996. Enhancing uptake and translocation of systemic active ingredients. Pp. 241-296 en Foy, C.L. y Pritchard, D.W. (eds.). Pesticide formulation and adjuvant technology. Boca Raton, Florida, CRC Press, 363p.

Finney, D. 1971. Probit Analyses. Cambridge University Press, Cambridge, p.333.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2004. Año Internacional del Arroz. [en línea] <[http://www.fao.org/rice2004/es/index\\_es.htm](http://www.fao.org/rice2004/es/index_es.htm)> [consulta: 15 Septiembre 2012].

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2012. Rice Market Monitor. [en línea] <<http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/ricemarket-monitor-rmm/en/>> [consulta: 15 Septiembre 2012].

France, A.; Gerding, M.; Sandoval, A. 2002. Pathogenicity of Chilean isolates of *Beauveria bassiana* to adults of *Asynonychus cervinus* (Coleoptera: Curculionidae) Agric. Tec. 62: 489-496.

Frizzo, C.; Oliveira, J.V. de O.; Castilhos-Fortes, R. de. 2005. Aplicação de fungos entomopatogênicos sobre *T. limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae), em condições de laboratório. Pp. 472-474 en Congresso Brasileiro de arroz irrigado, 4. 2005, Santa Maria. Anais. Santa Maria: Editora Orium.

Furlong, M.J.; Pell, J.K.; Choo, O.P.; Rahman, S.A. 1995. Field and laboratory evaluation of a sex-pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogen *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) by the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Bull. Entomol. Res. 85: 331-337.

Gillespie, A.T. 1988. The use of entomogenous fungi for pest control and role of toxins in pathogenesis. Pest. Sci. 27: 203-215.

Gómez, K. y Gómez, A.A. 1984. Statistical procedures for agricultural research, 2nd ed. Wiley y Sons. New York, USA. p. 680.

González, E.J.; Arregoces, P.O.; Hernández, L.R.; Parada, T.O. 1983. Insectos y acaros plagas y su control en el cultivo del arroz en América Latina. Bogotá: FEDEARROZ. 60p.

Guerzoni, M.E.; Lanciotti, R.; Cocconcelli, P.S. 2001. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. Microbiol., 147: 2255–2264.

Haddad, M.L. 1998. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. Pp.999-1013 en Alves, S.B. (ed). Controle microbiano de insetos. Fealq, Piracicaba, Brasil.

Hajek, A.E.; Butler, L.; Walsh, S. R.; Silver, J. C.; Hain, F. P.; Hastings, F. L.; Odell, T.M.; Smitley, D.R. 1996. Host range of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) pathogen *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) in the field versus laboratory. *Environmental entomology*, 25(4), 709-721.

Hall, R.A. y Papierok, B. 1982. Fungi as biological control agents of arthropods agricultural and medical importance. *Parasitology* 84: 205-240.

Hedegus, D. y Khachatourians, G. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol. Adv.* 13: 455-490.

Hirose, E.P.; Neves, M.O.J.; Zequi, J.A.C.; Martins, L.H.; Peralta, C.H.; Moino Jr., A. 2001. Effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 44 (4): 419-423.

Hong, T.D.; Ellis, R.H.; Moore, D. 1997. Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. *Ann. Bot.* 79: 121-128.

Hook, T.V. 1994. The conservation challenge in agriculture and the role of entomologists. *Florida Entomologist.* 77: 42-73.

Hou, R.F. y Chang, J. 1985. Cellular defense response to *Beauveria bassiana* in the silkworm, *Bombyx mori*. *App Ent. Zool.* 20 (2): 118-125.

Inglis, G.D.; Johnson, D.L.; Goettel, M.S. 1996. Effects of temperatura and thermoregulation on micosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. *Biol. Control* 7: 131-139.

James, R.R.; Croft, B.A.; Shaffer, B.T.; Lighthart, B. 1998. Impact of temperatura and humidity on host-pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a coccinellid. *Environ. Entomol.* 27: 1506-1513.

Jaronski, S.T. 2010. Ecological Factors in the Inundative Use of Fungal Entomopathogens. *BioControl.* 55: 159–185.

Jenkins, N.E., Heviefó, G., Langewald, J., Cherry, A., Lomer, C.J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information.* 19(1): 21-31.

Kassa, A. 2003. Development and testing of mycoinsecticides based on submerged spores and aerial conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of locusts,

grasshoppers and storage pests. Tesis Doctoral. Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek Göttingen.

Keller, S. y Zimmerman, G. 1989. Mycopathogens of soil insects. Pp. 240–270 en Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. (Eds.). Insect–Fungus Interactions. Academic Press, London, UK.

Khan, M. N.; Hayat, C.S.; Chaudhry, A.H.; Iqbal, Z.; Hayat, B. 1989. Prevalence of gastrointestinal helminths in sheep and goats at Faisalabad abattoir. Pakistan Vet. J., 9: 159-161.

Khush, G.S. 2005. What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. Plant Molecular Biology. 59: 1–6.

Kishino, K. 1993. Biología de pragas do arroz nos cerrados visando controle. Planaltina: Embrapa-CPAC. 71p. (EMBRAPA. Programa 01 - Recursos naturais: avaliação, manejo e recuperação. Subprojeto 01.0.88.032-07).

Kraemer, A.; Rigonato, R. y Simón, G., 2008. Protección del Cultivo. In: Arroz. Guía de Buenas Prácticas Agrícolas Para el Cultivo de Arroz en Corrientes. I.S.S.N. 1852-0618. Editores del libro: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Centro Regional Corrientes; Asociación Correntina de Plantadores de Arroz.

Kruger R.D.; A. Marín; A. Kraemer; G. Abascal. 2012. Muestreo de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) al momento de cosecha en lotes del arroz. Resultados Campaña 2011/12. Volumen XX Págs. 77-79. ISSN 0327-4209.

Kruger, R.D.; Rampoldi, A.; Posadas, J.; Nussenbaum, A.; Lecuona, R. 2012. Selección de hongos entomopatógenos para el control de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) y determinación concentración letal (CL50) para la cepa promisor. Pp. 86 en Resúmenes Protección Vegetal, 2012 - XIV Jornada Fitosanitaria Argentina, 2012, Potrero de los Funes, San Luis. Protección Vegetal.

Kruger R.D.; A. Marín; A. Kraemer; Nuñez, F.; Quiros Villalba, G.O.; Lecuona, R. 2013. Estudio del comportamiento de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) durante la época invernal. Resultados Campaña 2012/13. Volumen XXI Págs. 73-80. ISSN 0327-4209.

Lacey, L.A. y Goettel, M.S. 1995. Current developments in microbial control of insects and pests and prospects for the early 21st century. Entomophaga. 40: 3-27.

Latgé, J.P.; Papierok, B.; Sampedro, L. 1982. Agressivité de *Conidiobolus obscurus* vis-à-vis du puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* (Hom. Aphididae). I. Comportement des conidies sur la cuticule avant la pénétration du tube germinatif dans l'insecte. Entomophaga. 27 (3): 323-330.



- Lecuona, R.E.; Riba, G.; Cassier, P.; Clement, J.L. 1991. Alterations of insects epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B. Brongniartii*. J. Invertebr. Pathol. 58 (1): 10-18.
- Lecuona, R.E.; Papierok, B.; Riba, G. 1996. Hongos entomopatógenos. Pp 143-150 en Lecuona, R.E. ed. Microorganismos patógenos empleados en el Control Microbiano de insectos plaga.
- Lecuona R.E.; Edelstein, J.; Berretta, M.; La Rosa, F.; Arcas, A. 2001. Evaluation of *B. bassiana* (Hyphomycetes) strains as potencial agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae). Journal of Medical Entomology. 38(2): 172-179.
- Leite, L.G.; Batista Filho, A.; Almeida, J.E.M.; Alves, S.B. 2003. Produção de fungos entomopatogênicos. Ribeirão Preto: Livroceres. 92p.
- Li, D.P. y Holdom, D.G. 1994. Effects of pesticides on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycets). J. Invertebr. Pathol. 63: 209-211.
- Ligier D., 2008. Zonas arroceras. Pp. 9-10 en Guía de Buenas Prácticas Agrícolas para el Cultivo de Arroz en Corrientes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y Asociación Correntina de Plantadores de Arroz. Corrientes.
- Lindow, S.E.; Buchner, R.; Connell, J.; Koutsoukis, R. 2004. Epidemiological approaches to the control of walnut blight disease. Regents of the University of California. 2: 291-292.
- Link, D. 1997. Alguns locais de hibernação do percevejo da haste do arroz, *Tibraca limbativentris* na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. Pp. 322-324 en Reunión da cultura do arroz irrigado, 22. Balneário Camboriú. Anais. Itajaí: EPAGRI.
- Link, D. 1998. Controle de *Tibraca limbativentris*, pos-colheita em arroz irrigado. Pp. 347-349 en Reuniao nacional de pesquisa de arroz, 6, Golania, 1998. Anal. Golania: Embrapa-Arroz e Feijao.
- Loureiro, E.S. y Moino Jr, A. 2006. Patogenicidade de fungos hifomicetos aos pulgões *Aphis gossypii* (Glover) e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Neotrop. Entomol. 35: 660-665.
- Loureiro, J.; Pinto, G.; Lopes, T.; Dolezel, J.; Santos, C. 2005. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. Planta. 221: 815-822.

Luz, C. y Fargues, J. 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. Mycopathologia 138: 117-125.

Luz, C. y Fargues, J. 1998. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. J. Invertebr. Pathol. 72: 97-103.

Maclean, J.L.; Dawe, D.C.; Hardy, B.; Hettel, G.P. 2002. Rice Almanac. International Rice Research Institute, Philippines. 253p.

Madelin, M.F. 1963. Diseases caused by Hyphomycetous fungi. In Steinhaus, E. A. Ed. Insect. Pathology; and advanced treatise. New York Academic press. 2: 233-271.

MAGyP. 2012. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. [en línea] <<http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/agricultura/index.php>> [consulta: 15 octubre 2012].

Marcandier, S. y Khachatourians, G.G. 1987. Susceptibility of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Fab.) (Orthoptera: Acrididae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Wuillemin (Hyphomycete): influence of relative humidity. Can. Entomol. 119: 901-907.

Marques, E.J. y Villas Boas, A.M. 1973. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) no controle da cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata* Stal) no Nordeste do Brasil. In: Reuniao anual da sociedade entomológica do Brasil, 1, 1973, Viçosa. Livro de Resumos... Viçosa: 1973. p.70.

Marques, E.J.; Vilas Boas, A.M.; Pereira, C.E.F. 1981. Orientações técnicas para a produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) em laboratórios setoriais. Bol. Téc. Planalsucar. 3: 5-23.

Martins, J.F. da S.; Czepak, C.; Magalhaes, B.P.; Ferreira, E.; Lord, J.C. 1986. Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre *Tibraca limbativentris*, percevejo do colmo do arroz. Goiânia, Embrapa-CNPAP. Pesquisa em Andamento 59. 4 p.

Martins, J.F. da S. y Lima, M.G.A. 1994. Fungos entomopatogênicos no controle do percevejo-do-colmo do arroz *Tibraca limbativentris* Stal: Virulência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v.23, p.39-44.

Martins, J.F. da S.; Lima, M.G.A. de; Botton, M.; Carbonari, J.J.; Quintela, E.D. 1997. Efeito de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo-do-colmo do arroz, *Tibraca limbativentris* Stal. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal. 26 (2): 277-283.

Martins, J.F. da S.; Grutzmacher, A.D.; Cunha, U.S. 2004a. Descrição e manejo integrado de insetos-pragas em arroz irrigado. Pp. 635-675 en Gomes, A.S.; Magalhaes Jr., A.M. (Ed), Arroz irrigado no sul do Brasil. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas.

Martins, J.F. da S.; Botton, M.; Carbonari, J.J.; Quintela, E.D. 2004b. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. Ciência Rural. 34: 1681-1688.

McCauley, V.J.E.; Zacharuk, R.J.; Tinline, R.D. 1968. Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera). J. Invertebr. Pathol. 12: 444-459.

McClatchie, G.V.; Moore, D.; Bateman, R.P.; Prior, C. 1994. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. Mycol. Res. 98: 749-756.

Méndez, A.; Del Pozo, E.; García, I. 2009. Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. Rev Protección Veg. 24(3): 156-161.

Méndez, A.; Del Pozo, E.; García, I.; González, A. 2010. Evaluación de sustratos sólidos para la producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Rev. Protección Veg. 25 (2): 108-112.

Mendoca, A.F.; Rocha, I.C.B. 1992. Produção de *Metarhizium anisopliae* no Estado de Alagoas, Brasil. Pp. 141 en Simpósio de Controle Biológico, 3, 1992. Águas de Lindóia. Livro de Resumos. Águas de Lindóia.

Meneses Carbonell R.; Calvert L.; Yanis Gutierrez A.; Sousa Gómez J.; Concepción Hernández J. 2008. Manejo Integrado de los principales insectos y ácaros plagas del Arroz. Instituto de Investigaciones Del Arroz Cuba (IIArroz) – N° 716-2008.

Mielitz, L.R. 1993. Estudo da diapausa em *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) em condições de campo. [Tese de Doutorado]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. 159 f.

Miller, C.; Rancel, D.; Braga, G.; Flint, S.; Kwon, S.; Messias, C.; Roberts, D.; Anderson, A. 2004. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. Journal of Microbiology. 50: 41-49.

Milner, R.J. 1982. On the occurrence of the pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*, resistant to isolates of the fungal pathogen *Erynia neoaphidis*. Entomología Experimentalis et applicata. 32: 23-27.

Moino Jr., A.R. y Alves, S.B. 1998. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagem). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 27: 611-619.

Moino Jr., A.R. 2000. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. Pp. 186-193 en Bueno, V.H.P. (Ed.). Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras: UFLA.

Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. 63: 95-103.

Moore, D.; Bridge, P.D.; Higgins, P.; Bateman, R.; Prior, C. 1993. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. Ann. of Appl. Biol. 122: 605-616.

Moore, J. 2002. Parasites and the behaviour of animals. Oxford., UK: Oxford Univ. Press. p 338.

Neves, P.M.O.J.; Hirose, E.; Tchujo, P.T.; Moino Jr., A. 2001a. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. Neotropical Entomol. 30: 263-268.

Neves, P.M.O.J.; Santoro, P.H.; Beleia, A. 2001b. Produção de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes tipos de arroz e técnicas de preparo. Pp. 388 en Simpósio de Controle Biológico, 7, 2001, Poços de Caldas. Livro de Resumos. Poços de Caldas.

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

Nussenbaum, A. L. y Lecuona, R. 2012b. Effect of temperature on radial growth of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates pathogenic to boll weevil, *Anthonomus grandis*. International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. 1: 61.

Oliveira, J.V.; Dotto, G.M.; Santos, J.L.R. 2005. Levantamento populacional do percevejo *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) na região da depressão central do Rio Grande do Sul. Pp. 103-104 en Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 4., 2005, Santa María. Anais. Santa María: UFSM.

Omoto, C. 2000. Modo de ação de inseticidas e resistência de insetos a inseticidas. In Bases e técnicas do manejo de insetos. Guedes, J.C.; da Costa, I.D.; Castiglioni, E. (Org.) Santa Maria: UFSM/CCR/DFS. Pallotti. 31-49

Ottati-de-Lima, E.L. 2007. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. E *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Ottati-de-Lima, E.L.; Batista Filho, A.; Almeida, J.E.M.; Gassen, M.H.; Wenzel, I.M.; Almeida, A.M.B. de; Zapellini, L.O. 2010. Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 77 (4) 651-659.

Pacheco, S.C. 2002. Efectividad biológica de los entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., sobre el picudo del agave tequilero *Sycophorus acupunctatus* Gyll. Pp. 59 en Atotonilco, J. Tesis Profesional. Universidad autonoma Chapingo. Departamento de Parisotolia agricola. Chapingo, Mex.

Parella, P.M. y Lewis, T. 1997. Integrated pest management (IPM) in field crops. Pp. 599-614 en Lewis, T. (ed). Thrips as Crop Pests. CAB International, Wallingford, UK.

Pazini, J.B; Botta, R.A.; Silva, F.F. 2011. Efeito do manejo do solo em pós-colheita sobre a população do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) em arroz irrigado. Manejo de insetos e outros fitófagos. VII Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado (CBAI).

Pekrul, S. y Grula, E.A. 1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. J. Invertebr. Pathol. 87: 238-247.

Pérez, P.R. 1997. Evaluación de la eficacia del bioinsecticida a base de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en el control de *Acanthoscelides obtectus* (Say.) (Coleoptera: Bruchidae) en condiciones de laboratorio en Chapingo Mexico. Tesis profesional. Universidad Autonoma Chapingo. Departamento de Parasitologia agricola. Chapingo, Mex. 57 p.

Posadas, J.B. y Lecuona, R.E. 2009. Selection of Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the Microbial Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology. 46 (2): 284-291.

Posadas, J.B.; Comerio R.M.; Mini, J.; Nussenbaum, A.L.; Lecuona, R. 2012. A novel dodine-free selective medium based on the use of Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) to isolate *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* sensu lato and *Paecilomyces lilacinus* from soil. *Mycologia*.104 (4): 974-980

Prando, H.F.; Kalvelage, H.; Ferreira, R.A. 1993. Ciclo de vida de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera, Pentatomidae) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia*. 37 (21): 335-339.

Prando, H.F. 2003. Estudo do comportamento do percevejo-do-colmo (*Tibraca limbativentris*) em arroz irrigado, sistema de cultivo pré-germinado. Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 3., 2003, Balneário Camboriú. Anais. Itajaí: Epagri. p.412-414.

Prando, H.F.; Nones, D.; Eberhardt, D.S.; Noldin, J.A. 2003. Utilização do marreco-de-pequim (*Anas* sp.) no controle do percevejo-do-colmo (*Tibraca limbativentris*), em arroz irrigado. Pp. 424-425 en Congresso Brasileiro de arroz irrigado, 3. 2003, Balneário Camboriú. Anais. Itajaí: Epagri.

Prasertphon, S. y Tanada, Y. 1968. The formation and circulation, in *Galleria*, of hyphal bodies of entomophthorous fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 260-280.

Prior, C. y P. Jollands. 1988. Infectivity of oil and water formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Invert. Pathol.* 52: 66-72.

Privalle, C.T. y Fridovich, I. 1987. Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2723-2726.

Purwar, J.P. y G.C. Sachan. 2006. Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillar *Spilarctia oblique* (Lepidoptera: Arctiidae) *Microbiol. Res.* 161(1): 38-42.

Ramle, M.; Mohd, B.W.; Siti, R.A.; Norman, K. 2004. The effects of oils on germination of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and its infection against the oil palm bagworm, *Metisa plana* (Walker). *J. Oil Palm Res.* 16 (2): 78-87.

Ramoska, W.A. 1984. The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the chinch bug, *Blissus leucopterus*. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 389-394.

Rampelotti, F.T.; Mattos, M.L.; Grützmacher, A.D.; Martins, J.F.S.; Prando, H.F. 2005. Seleção preliminar de isolados de *Metarhizium anisopliae* para o controle microbiano de *Tibraca limbativentris*. Pp.123-125 en Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 4., 2005, Santa Maria. Anais. Santa Maria: UFSM.

Rampelotti, F.T.; Ferreira A.; Prando, H.F.; Grutzmacher, A.D.; Martins, J.F. da S.; Tcacenco, F.A.; Mattos, M.L.T. 2007a. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. Arquivos do Instituto Biológico, Londrina. 74 (2): 141-148.

Rampelotti, F.T.; Prando, H.F.; Martins, J.F. da S.; Ferreira, A.; Tcacenco, F.A.; Grutzmacher, A.D. 2007b. Compatibilidade de herbicidas utilizados na cultura do arroz com o fungo *Metarhizium anisopliae*, visando o controle do percevejo-do-colmo do arroz. Pp. 39-41 en Congresso Brasileiro de arroz irrigado, 5., 2007, Pelotas. Anais. Pelotas: Embrapa Clima Temperado.

Rampelotti, F.T.; Ferreira, A.; Prando, H.F.; Tcacenco, F.A.; Grutzmacher, A.D.; Martins, J.F. da S. 2010. Seletividade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado ao fungo *Metarhizium anisopliae*, agente de controle microbiano de *Tibraca limbativentris*. Ciência Rural, Santa Maria. 40 (4): 745-751.

Rangel, D.E.N.; Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. 2004. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on artificial and natural substrates. J. Invertebr. Pathol. 87: 77-83.

Rangel, D.E.N.; Braga, G.U.L.; Anderson, A.J.; Roberts, D.W. 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. J. Invertebr. Pathol. 88: 116-125.

Reddy, G.V.P.; Furlong, M.J.; Pell, J.K.; Poppy G.M. 1998. *Zoophthora radicans* infection inhibits the response to and production of sex pheromone in the diamondback moth. J. Invertebr. Pathol. 72: 167-169.

Rezende, J.M.; Dias Quintela, E.; Milhomem Morais, M. 2008. Determinação da CL50 e CL90 de *Metarhizium anisopliae* para ovos de *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae). In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 22., 2008, Uberlândia. Ciência, tecnologia, inovação. Uberlândia: SEB.

Rezende, J.M.; Oliveira, D.G.P.; Pauli, G.; Barros, S.A.V.; Delalibera Jr, I. 2011. Diferentes tipos de arroz e aditivos e a influência na produção de *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). En: Simpósio de Controle Biológico, 2011, São Paulo. Resumos do Simpósio de Controle Biológico.

Riffel, C.T., Prando, H.F., and Boof, M.I. 2010. Primeiro relate de ocorrência de *Telenomus podisi* (Ashmead) e *Trissolcus urichi* (Crawford) (Hymenoptera: Scelionidae) como parasitóides de ovos do percevejo-do-colmo-do-arroz, *Tibraca limbativentris* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae), em Santa Catarina. Neotrop. Entomol. 39: 447-448.

Rizzo, H.F. 1976. Hemipteros de interés agrícola, chinches perjudiciales y chinches benéficas para los cultivos. Buenos Aires, Hemisferio Sur, 69p.

Roberts, D.W. 1966. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. J. Invertebr. Pathol. 8: 212-221.

Roberts, D.W.; Fuxa, J.R.; Gaugler, R.M.; Goettel, R.J.; Maddox, J. 1991. Handbook of pest management in agriculture. CRC Press, Boca Raton, FL.

Roessler, Y. 1989. Insecticidal bait and cover sprays. Pp. 329-336 en Robinson, A.S.; Hoopfer, G. (eds). Fruit flies: their biology, natural enemies and control. World Crop Pests. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Rombach, M.C.; Aguda, R.M.; Shepard, B.M.; Roberts, D.W. 1986. Entomopathogenic fungi in the control of the black bug of rice, *Scotinophara coarctata* (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of Invertebrate Pathology. 48 (2): 174-179.

Rose, M. y DeBach, P. 1992. Biological control of *Parabemisia myricae* (Kuwana) (Homoptera: Aleyrodidae) in California. Israel Journal of Entomology. 25: 73-95.

Sahayaraj, K. y Karthick, S. 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and byproducts. Afr J. Biotechnol. 7 (12): 1907-1910.

Samish, M. y Rehacek, J. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. Ann. Rev. Entomol. 44: 159-182.

Samuels, R.J.; Reynolds, S.E.; Charnley, A.K. 1988. Calcium channel activation of insect muscle by destruxin, insecticidal compounds produced by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Comp. Biochem. Physiol. 90: 403-412.

Santos, R.S.S. dos; Prando, H.F.; Redaelli, L.R.; Diefenbach, L.M.G.; Rromanowski, H.P. 2002. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em adultos hibernantes de *Oebalus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). Neotropical Entomology, Londrina, 31 (1): 153-155.

Setlow, B. y Setlow, P. 1995. Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4109-4112.

Sistema Integrado de Información Agropecuaria (SIIA). 2012. Series y estadísticas. [en línea] <<http://www.sii.gov.ar/index.php/series-por-tema/agricultura>> [consulta: 15 Octubre 2012].



Silva, A.G.A.; Gonzales, C.R.; Galvão, D.M.; Gonçalves, A.J.L.; Gomes, J.; Silva, M.N.; Simoni, L. 1968. Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: seus parasitos e predadores. Rio de Janeiro, D.D.I.A.-M.A., 622p.

Silva, C.C.A.; Cordeiro, D.M.; Laumann, R.; Moraes, M.C.B.; Barrigossi, J.A.; Borges, M. 2004. Ciclo de vida e metodologia de criação de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Heteroptera: Pentatomidae) para estudos de ecologia química. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 16p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n.78).

Silva, M.T.B. y Klein, V.A. 1997. Efeito de diferentes métodos de preparo do solo na infestação e danos de *Sternechus subsignatus* (Boheman) em soja. Ciência Rural, 27: 533-536.

Silva, R.B.Q. y Veiga, A.F.S.L. 1998. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, sobre *Castnia icarus* (Cramer, 1775). Ver. Agric. 73: 119-127.

Silvie, P. y Papierok, B. 1991. Natural enemies of insect pests on cotton in Chad: preliminary data on entomopathogenic fungi. Coton Fibres Tropicales. 46: 304–308.

Small, C.L.N. y Bidochka, M.J. 2005. Up-regulation of Pr1, a subtilisin like protease during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. 109: 307-313.

Tanada, Y. y Kaya, H.K. 1993. Insect Pathology. Academic Press, New York, NY, p 413.

Tauber, M.J., Tauber, C.A. y Masaki, S. 1986. Seasonal Adaptations of Insects. Oxford University Press, New York.

Teera-Arunsiri, A.; Suphantharika, M.; Ketunuti, U. 2003. Preparation of Spray – Dried wetttable powder formulations of *Bacillies thuringiensis* based Biopesticides. J. Econ. Entomol. 96 (2): 292-299.

Tefera, T. y Pringle, K.L. 2003. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. J. Invertebr. Pathol. 84: 220-225.

Terán, F.O. 1971. Plagas del arroz en Santa Cruz. Santa Cruz: Estación Experimental Agrícola de SAVEDRA. 8 p. (Boletim Técnico, 45).

Tigano-Milani, M.S.; Gomes, A.C.M.M.; Sobral, B.W.S. 1993. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e

*Paecilomyces sp.* em solos de diferentes regioes do Brasil. Anais da Sociedade Entomologica do Brasil. 22 (2) 391-393.

Tigano-Milani, M.S.; Gomes, A.C.M.M.; Sobral, B.W.S. 1995. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology. 65: 206-210.

Trujillo, M.R. 1970. Contribuição ao conhecimento do dano e biologia de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera- Pentatomidae) praga da cultura do arroz. Piracicaba: USP-ESALQ. 63p. Tese mestrado.

Trujillo, M. R., 1991. Chinche grande del Arroz: Biología y Control. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria, Corrientes, Argentina, 16 pp.

Tyrrell, D. 1977. Occurrence of protoplast in the natural life cycle of *Entomophthora egressa*. Exp. Mycol. 7: 414-422.

URCAMP (Universidade da Regiao da Campanha). 2008. Projeto busca desenvolvimento da orizicultura regional. <[www.urcamp.tche.br/urcamp/portal](http://www.urcamp.tche.br/urcamp/portal)>. (Acesso em: 25/10/2008).

Vara, J. y Marín, A.R. 2008. Preparación del terreno. In: Arroz. Guía de Buenas Prácticas Agrícolas Para el Cultivo de Arroz en Corrientes. I.S.S.N. 1852-0618. Editores del libro: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Centro Regional Corrientes; Asociación Correntina de Plantadores de Arroz.

Vega, F.E. y Blackwell, M. 2005. Insect-Fungal associations. Ecology and evolution. Ed. Oxford. University press., p 297.

Vélez, P.A.; Posada, F.J.; Marin, P.; Gonzalez, M.T.; Osorio, E.; Bustillo, A.E. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Investigaciones del café. Boletín Técnico. 17: 37.

Vey, A. 1971. Etude des reaction cellulaires anticriptogamique chez *Galleria melonella* L.: structure et ultrastructure des granulomes á *Aspergillus niger*. V. Tiegh. Ann. Zool. Ecol. Anim. 3: 17-30.

Vey, A. y Vago, C. 1971. Reactions anticriptogamique de type granulome chez les insectes. Ann. Institute Pasteur. 121: 527-532.

Vey, A.; Fargues, J.; Robert, P.H. 1982. Histological and ultrastructural studies of factors determining the specificity of pathotypes of the fungus *Metarhizium anisopliae* for Scarabeid larvae. Entomophaga. 27: 287-397.

Vey, A. y Gotz, P. 1986. Antifungal cellular defense mechanisms in insects. Pp. 89-115 en Gupta, A.P. Ed. Hemocytic and humoral immunity in arthropods. New York, John Wiley.

Vilas Boas, A.M.; Andrade, R.M.E; Oliveira, J.V. 1996. Diversificação de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos. Arq. Biol. Tec. 39: 123-128.

Villacorta, A. 1977. Technique for the mass culture of the entomophagous fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin in granular form. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Piracicaba. 5: 101-104.

Volcy, C. y Pardo, V.M. 1994. Principios de micología. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, p 141.

Walstad, J.D.; Anderson, R.F.; Stambaugh, W.J. 1970. Effect of environmental conditions on 2 species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). J. Invert. Pathol. 16: 221-226.

Yamamoto, P.T.; Roberto, S.R.; Pria Jr, W.D.; Felipe, M.R.; Miranda, V.S.; Teixeira, D. do C.; Lopes, J.R.S. 2002. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. Summa Phytopathologica. 28 (2): 178-181.