



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE JUJUY**

**HONGOS ENTOMOPATÓGENOS: UNA ALTERNATIVA
PARA LA REGULACIÓN DE LAS POBLACIONES DE MOSCAS BLANCAS
(HEMIPTERA, ALEYRODIDAE) EN HORTALIZAS.**

Tesina de grado para acceder al título de “Licenciado en Ciencias Biológicas”

ALUMNA: ROJAS, MARÍA NAZARENA RAMONA

MARZO 2010

ÍNDICE

Resumen.....	i
Agradecimientos.....	ii

CAPITULO 1. Marco conceptual

1.1 La agricultura.....	1
1.1.1 Importancia de las Hortalizas	1
1.1.2 Producción hortícola en Jujuy	2
1.2 Taxonomía y biología de la “mosca blanca” (Aleyrodidae)	2
1.2.1 Características biológicas de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (mosquita blanca de los invernaderos)	3
1.2.2 Daños.....	5
1.3 Modelo agroecológico.....	5
1.4 Control Biológico	6
1.5 Microorganismos entomopatógenos como reguladores de plagas.....	8
1.5.1 Los hongos entomopatógenos	8
1.5.2 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos	10
1.6 Clasificación taxonómica de los hongos entomopatógenos	11
1.6.1 Características de los hongos del “phylum” Ascomycota.....	11
1.6.2 Características de la especie <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin.....	11

CAPITULO 2. Del problema a la hipótesis

2.1 Fundamentación.....	13
2.2 Planteo del problema.....	13
2.3 Hipótesis del trabajo.....	14
2.4 Objetivo General	14

CAPITULO 3. Biología de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y su cría

3.1 Introducción.....	15
3.2 Cría artificial de <i>T. vaporariorum</i>	15
3.2.1 Materiales y metodología.....	15
3.2.2 Resultados.....	17

3.2.3 Discusión.....	19
3.2.4 Conclusión.....	19

CAPITULO 4. Muestreos a campo de insectos, aislamiento y selección de hongos entomopatógenos de mosca blanca

4.1 Introducción.....	20
4.1.1 Caracterización de los ambientes muestreados.....	20
4.2 Muestreos a campo en dos ambientes con manejos productivos diferentes ...	22
4.2.1 Materiales y metodología.....	22
4.2.2 Resultados.....	24
4.2.3 Discusión y Conclusión.....	26

CAPITULO 5: Caracterización de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin de la zona hortícola de Jujuy

5.1 Introducción.....	28
5.2 Aislamiento de <i>B. bassiana</i>	28
5.2.1 Materiales y Metodología.....	28
5.3 Reactivación de cepas nativas conservadas en el laboratorio de Fitopatología.....	29
5.4 Biovaloraciones in vitro de las cepas nativas	29
5.4.1 Determinación del tiempo medio de germinación (TG_{50} = tiempo para que germine el 50% de los conidios).....	29
5.4.2 Determinación del crecimiento radial de colonias	30
5.4.3 Producción de conidios por colonia	30
5.5 Resultados.....	31
5.5.1 Aislamiento y cultivo del hongo.....	31
5.5.2 Reactivación de la cepa Bb007.....	32
5.5.3 Tiempo medio de Germinación (TG_{50}).....	32
5.5.4 Crecimiento Radial de la Colonia	33
5.5.5 Producción de conidios por colonia	34
5.6 Discusión.....	35
5.7 Conclusión.....	35

CAPITULO 6. Bioensayos in vitro sobre ninfas N II -III y N IV

6.1 Introducción.....	36
6.2 Determinación del tiempo de letalidad al 50% (TL _{50%}) y tiempo medio de sobrevivencia (TMS).....	36
6.2.1 Materiales y metodología.....	36
6.3 Bioensayos sobre ninfas II-III y IV in vitro, sobre hojas desprendidas de tomate.....	37
6.3.1 Materiales y metodología.....	37
6.4 Resultados.....	38
6.4.1 Determinación del TL _{50%}	38
6.4.2 Determinación del TMS.....	40
6.4.3 Bioensayos sobre N II-III y N IV in vitro, sobre hojas desprendidas de tomate.....	42
6.5 Discusión.....	45
6.6 Conclusión.....	45

CAPITULO 7. Bioensayos in vivo sobre ninfas N II -III y N IV

7.1 Introducción.....	46
7.2 Materiales y metodología.....	46
7.3 Resultados.....	47
7.4 Discusión.....	50
7.5 Conclusión.....	50

CONCLUSIÓN FINAL.....	51
------------------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA.....	52
--------------------------	-----------

RESUMEN

La mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), es uno de los organismos perjudiciales de mayor importancia en las hortalizas, particularmente en el cultivo de tomate, que afecta gravemente a los productores de la provincia de Jujuy . El control con insecticidas sintéticos ha generado desequilibrios no sólo entre las poblaciones del insecto, sino también en el medio ambiente. Diversos trabajos de investigación han demostrado la efectividad de los hongos entomopatógenos en la regulación de poblaciones de mosca blanca. El objetivo de este trabajo fue evaluar la patogenicidad de dos cepas nativas de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin (Bb008 y Bb007) sobre ninfas de *T. vaporariorum*, con el propósito de buscar una alternativa limpia y ecológica, capaz de contribuir a mejorar la sostenibilidad del agroecosistema hortícola. Se realizaron muestreos en zonas hortícolas, manejadas en el marco de un sistema agroecológico, y se aisló de mosca blanca la cepa (Bb008) de *B. bassiana*. Se determinó tiempo letal medio (TL_{50%}) y el tiempo medio de sobrevivencia (TMS) para ninfas IV. Se registraron los porcentajes de mortalidad in vitro e in vivo de ninfas II-III y IV de *T. vaporariorum*, expuestos a concentraciones de 10⁸ conidios x ml⁻¹ de ambas cepas, utilizándose un tratamiento control con agua en cada caso. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, de tres tratamientos y cinco repeticiones. Se determinó mediante la mortandad de ninfas en cada caso. El TL_{50%} y el TMS para N IV tratadas con Bb007 y Bb008 fue de 3,4 días y 3,7 días respectivamente. Los ensayos in vitro, registraron diferencias significativas con el testigo, aunque no entre las cepas, ambas registraron un porcentaje de mortandad medio del 99% sobre ninfas II-III y IV. En los ensayo in vivo, el porcentaje de mortandad medio para ninfas II-III fue del 45% para Bb007 y del 55% para Bb008. Para ninfas IV, Bb007 un porcentaje de mortandad medio del 98% y Bb008 del 95%. Se concluye que ambas cepas nativas constituyen una alternativa posible para la regulación de la “mosquita blanca de los invernaderos” *T. vaporariorum*.

AGRADECIMIENTOS

Al jurado por su tiempo, por las correcciones y valiosos aportes que han hecho de mi tesis un mejor trabajo.

Al MCs Mario Bonillo por brindarme la posibilidad de conocer el fascinante mundo de la agroecología y haberme dado su apoyo para realizar mi tesis.

A la Ing. Susana Álvarez por toda su colaboración en lo profesional, porque me enseñó a hacer mejor mi trabajo y sobre todo por ser mi amiga en todos los aspectos de mi vida, por mostrarme lo bueno de las cosas y no dejarme nunca sola.

A la Ing. Silvia Tapia, por su asesoramiento en el aspecto técnico y poner a mi disposición herramientas prácticas y útiles para poder desarrollar mi trabajo.

A mis padres Jorge e Irma, por acompañarme y apoyarme durante toda mi vida, en mi carrera y especialmente durante esta última etapa, de concreción de mi tesis, por enseñarme a descubrir que vale la pena superarse día a día, y que la constancia es el camino al éxito. A mis hermanos Graciela, Alejandro, Javier, David, a mis cuñados Daniel y Andrea y a mis sobrinos por alentarme en todo momento. A mis amigos y compañeros de la facultad y a Cristian por su paciencia y cariño.

CAPITULO 1. Marco conceptual

1.1. La agricultura

La primera intervención que realiza el hombre en su medio ambiente, es aquella que se produce cuando éste, deja su condición nómada y cazadora para convertirse en sedentario y agricultor. El agricultor hace tala rasa de una superficie de terreno virgen donde convivían en perfecto estado de equilibrio una serie de especies que se regulaban entre sí, transformando la diversidad del suelo en una precaria e inestable uniformidad. El hombre logra en este marco, generar las condiciones adecuadas para el desarrollo de un monocultivo de interés económico, pero promueve la vulnerabilidad de éste a la acción de sus predadores naturales, que progresivamente se transformarán en plaga, debido a la ausencia de un oponente natural que los regule (Herrera García, 2007).

Sarandón (2002), sostiene que la baja diversidad se agrava por el hecho de que, en varios países se utilizan sólo unas pocas variedades las más “exitosas” de estos cultivos en amplias superficies, incrementando la fragilidad del sistema y el riesgo de que la producción de alimentos sea devastada por una plaga o patógeno.

La gran abundancia de pocas especies de cultivos promovió en estos, la susceptibilidad a enfermedades y plagas, que son más severas cuanto mas abundantes y uniformes sean los cultivos (Tilman y otros, 1999).

Las prácticas agrícolas de los últimos 50 años denotan una brusca reducción de la biodiversidad en los ecosistemas, ya que se ha reemplazado la biota natural por una población artificial de uno o pocos cultivos en grandes áreas. Por ello se dice que la agricultura en muchos contextos ha reducido esta diversidad al máximo.

1.1.1 Importancia de las Hortalizas

En los últimos años, la producción hortícola moderna ha incrementado la producción por hectárea y rentabilidad, conjuntamente con la tecnología aplicada. Sin embargo esta situación trajo aparejado problemas fitosanitarios (plagas y enfermedades de las plantas) y junto con ello el uso de agroquímicos.

La importancia de las hortalizas radica en que al ser productos que se consumen en general frescos, son rápidamente perecederos en su mayoría, lo que hace que se

comercialicen en mercados frágiles. Además esta situación genera que los productores muchas veces no “puedan” respetar el tiempo que debe transcurrir después de una “fumigación con plaguicidas” para cosechar los mismos, enviando el producto antes de tiempo y con residuos de los mismos plaguicidas al mercado. Las hortalizas producidas bajo estos sistemas, pueden resultar contaminadas con el consiguiente efecto contaminante para aquellas personas vegetarianas. Además el efecto de los compuestos “NUTRACEUTICOS” naturales de las hortalizas pueden ser totalmente oscurecidos por los residuos cancerígenos de los agroquímicos a los que fueron expuestos las hortalizas (Bonillo, 2008).

1.1.2 Producción hortícola en Jujuy

En la provincia de Jujuy la actividad hortícola es muy importante. Las principales zonas productoras de la provincia se encuentran en el Valle y las Yungas, como el Carmen, Perico, la localidad de Palma Sola, Caimancito, Aguas Calientes, Fraile Pintado, Yuto, entre otros. Dentro de los graves problemas fitosanitarios resultan importantes por los daños directos e indirectos, las “moscas blancas”, cuyas poblaciones fueron incrementándose y diseminándose hacia otras zonas. Desde 1997 ya se registran estos insectos, en la zona de Aguas Calientes, afectando cultivos de tomate, zapallito, berenjena, chaucha y tabaco, entre otros; perjudicando de esta manera, la producción de hortalizas en la provincia (Agostini y otros 2005).

1.2 Taxonomía y biología de la “mosca blanca” (*Aleyrodidae*)

Las moscas blancas, pertenecen al orden Hemiptera, suborden Homoptera, serie Sternorrhyncha, superfamilia Aleyrodoidea y familia Aleyrodidae.

En la actualidad se han descripto más de 1200 especies de moscas blancas, pero sólo unas cuantas tienen relevancia en el orden agrícola, como *Aleyrodes spiraeoides* (Quaintance) en papa; el complejo *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Malvaceae y Solanaceae y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en Brassicaceae, Fabaceae, Malvaceae y Solanaceae (Viscarret, 2000).

Los adultos miden entre 1-3 mm. La cabeza, diferenciada del tórax, posee un par de ojos compuestos voluminosos, más o menos reniformes, dividido en dos y dos ocelos ubicados cerca del borde superior de los ojos. Las antenas anilladas, con relieves y presencia de sensorios olfatorios, rinarias, están compuestas por siete

artejos. Poseen aparato bucal picador-suctor y dos pares de alas membranosas. El cuerpo y las alas están cubiertos por una fina capa de cera blanca pulverulenta (Agostini y otros, 2005).

Presentan sexos separados, reproducción sexual y asexual o partogenética (los huevos de hembras vírgenes producen machos, mientras que las que han copulado dan origen a los dos sexos) (López Ávila, 2008).

Algunos estudios indican que una hembra es capaz de ovipositar hasta 300 huevos durante su vida (López Ávila, 2008).

Son insectos pequeños, muy polípagos, con una tasa de reproducción potencialmente alta, y una gran capacidad dispersiva.

La metamorfosis es de tipo neometabólica, esto implica que en el llamado estado “pupal” no se producen fenómenos de histólisis e histogénesis.

El ciclo de vida de los *Aleyrodidos* presenta los siguientes estados de desarrollo:

Huevo, Ninfa y Adulto. Durante el estado ninfal se suceden cuatro estadios Ninfa I, Ninfa II, Ninfa III y Ninfa IV. A su vez, el último estadio ninfal (NIV) conocido también como “pupa”, se subdivide en tres etapas NIV₁, NIV₂ y NIV₃.

1.2.1 Características biológicas de *Trialeurodes vaporariorum* (mosquita blanca de los invernaderos)

El ciclo biológico de *Trialeurodes vaporariorum*, se inicia con la oviposición que las hembras realizan en el envés de las hojas. Los huevos generalmente son puestos en círculos ordenados o semi-círculos, adheridos a la misma a través de un pequeño pedicelo, que se extiende desde su base.

Hill (1969) hace una descripción muy precisa y concreta de cada etapa del desarrollo, mencionando que una vez que los huevos son fijados en la hoja, estos presentan una coloración blanco amarillento y en pocos días, se tornan marrón oscuro, hasta casi negros.

Las posturas son fácilmente distinguibles a simple vista, y la duración media de este estadio es de 9 días a 21°C (Agostini y otros, 2005).

Las ninfas I (NI) son traslúcidas, aplanadas, ovales y móviles, presentan patas, antenas y 17 pares de setas marginales. Miden aproximadamente 0.28mm de largo y 0.16mm de ancho (Hill, 1969) y luego de ambular unas horas, se fijan a la hoja para alimentarse. La duración media de este estadio es de 4 días a 21°C

(Agostini y otros, 2005).

Las ninfas II (NII) son ovales y difieren ampliamente de la anterior, debido a la ausencia de una serie de setas marginales, la degeneración de antenas y patas y la forma y posición del orificio vasiforme. Las setas marginales anteriores y posteriores son pequeñas y no siempre notorias, mientras que las setas caudales están muy desarrolladas. Presenta dos pares de setas dorsales prominentes, una en el octavo segmento abdominal y la otra en la región cefálica (Hill, 1969). Las ninfas de éste estadio, son fácilmente distinguibles *in vivo*, por ser más grandes y transparentes. La duración media de este estadio es de 3 días a 21°C (Agostini y otros, 2005).

Las ninfas III (NIII) son semejantes a las del estadio NII. Dificultándose su reconocimiento *in vivo*, sin embargo ayuda el hecho de ser más grandes, aplanadas y más transparentes que las ninfas del segundo instar. La duración media de este estadio es de 4 días a 21°C (Agostini y otros, 2005).

En ambos estadios (NII y NIII) la alimentación es activa, por lo que comienzan a secretar abundante sustancia azucarada (melado) que atrae a hormigas melívoras y favorece el desarrollo de fumagina (hongo saprofita, de crecimiento epífita).

En el último estadio ninfal (NIV), el cuerpo se torna amarillento opaco y hacia la finalización del mismo, el cuerpo se eleva, constituyéndose una "pupa". Mide aproximadamente 0.76mm x 0.50mm (Hill, 1969). Durante éste período, el insecto no se alimenta, y se distinguen tres subestadio: NIV₁, NIV₂, NIV₃. El orificio vasiforme es una característica muy importante en este estadio, ya que permite una identificación taxonómica a nivel de especies. Hacia la finalización de este estadio comienzan a manifestarse a través de la cutícula, los ojos rojos. Finalmente el adulto emerge del pupario, a través de una ruptura en forma de T invertida. La duración promedio del estadio NIV es de aproximadamente 11 días a 21°C (Agostini y otros, 2005).

El cuerpo tiene un color amarillo opaco y las alas blancas. Cuando se encuentran en reposo, permanecen en forma plana sobre el abdomen. Generalmente y sobre todo en las hembras, las alas quedan levemente traslapadas en la línea media del dorso. Éstas presentan los márgenes anteriores curvados y redondeados en el primer par. El abdomen posee una superficie cerosa y estriada, siendo en las hembras, más grandes que en los machos. Éstos presentan una hilera de poros sobre la superficie dorsal del abdomen (Hill, 1969).

En los últimos años, en las regiones tropicales y subtropicales se han incrementado

exponencialmente los niveles poblacionales de mosca blanca, convirtiéndose en uno de los “organismos perjudiciales” de mayor importancia en la actividad productiva (Agostini y otros 2005).

1.2.2 Daños

Las moscas blancas provocan daños directos e indirectos a sus hospederos. Se destacan dentro de los primeros por su “acción alimentaria”, el debilitamiento de la planta hospedera; la excreción de sustancias azucaradas que tapiza la superficie de diferentes órganos dificultando el proceso de evapotranspiración.

Dentro de los daños indirectos sobresale, independiente del tamaño de la población, la transmisión de importantes virosis al cultivo en etapas tempranas de los mismos (almacigo), a ello se suma que la producción de melado de ninfas y adultos, genera un ambiente para el desarrollo de hongos saprófagos (*Capnodium sp.*), de color negruzco llamados fumagina. Este segundo daño suele ser importante por causar la depreciación de la calidad comercial de los productos hortícolas.

Las virosis transmitidas por las moscas blancas suelen ser críticas en las etapas tempranas del cultivo. Ello implica un manejo adecuado de los almácigos, donde la práctica más eficiente para evitar la infestación es el aislamiento, mediante mallas antiáfidos por ejemplo, no hay experiencias exitosas de control químico de vectores y reducción significativa de virosis.

1.3 Modelo agroecológico

El uso de agroquímicos, es la práctica agrícola más común empleada para contrarrestar la población de estos insectos. Pero según varios trabajos realizados éstos generan un impacto negativo ya que muchos agroquímicos afectan la fecundidad, la fertilidad, el número de generaciones y la longevidad de insectos, ácaros y demás organismos convirtiéndolos en plagas (Consuegra y Pozo, 1996; Vigiani, 2005). Además de intoxicaciones en agricultores, durante las aplicaciones, y a los consumidores por los contenidos de residuos tóxicos en los productos (Pimentel y otros, 1995).

Crespo (2002), reafirma que el control químico disminuye las posibilidades del control biológico, ya que determina la desaparición de enemigos o depredadores naturales locales de las plagas, y además afecta también la existencia de nichos adecuados para la reproducción de biocontroladores.

No obstante, existen alternativas al control químico, para el manejo y regulación de las poblaciones de moscas blancas, el “control biológico”, siendo una de las más promisorias, en un plan de manejo integrado y/o agroecológico.

El modelo agroecológico es un nuevo paradigma, que intenta dar soluciones novedosas teniendo en cuenta las interacciones de todos los componentes físicos, biológicos y socioeconómicos de los sistemas agropecuarios integrando este conocimiento en el ámbito regional para una producción sustentable (Sarandón, 2002).

En agroecología, la biodiversificación es la técnica principal para restaurar la autorregulación y la sustentabilidad (Altieri, 1999a).

En los agroecosistemas, la biodiversidad promueve una variedad de servicios ecológicos, más allá de la producción de alimentos, incluye por ejemplo, el reciclado de nutrientes, la regulación de microclimas y procesos hidrológicos locales, y la supresión de organismos indeseables (Altieri, 1999b).

Como sostiene Crespo (2002), la conservación de la biodiversidad favorece ampliamente los procesos de control biológico. Resalta también, que habrá mejor posibilidad de encontrar a los predadores locales, en tanto y en cuanto existan los nichos ecológicos.

1.4 El control biológico

El control biológico se define como el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plaga determinada, haciendo ésta menos abundante y por tanto menos dañina que en ausencia de aquellos (Van Driesche y Bellows, 1996).

Esta técnica fue concebida a principios del siglo XIX, con el objeto de denotar el importante papel que desempeñan los organismos entomófagos en la naturaleza (Badii y Abreu, 2006).

Por otra parte Altieri y Nicholls (2000) señalan que el Control Biológico por medio de la importación, incremento, y/ o conservación, de enemigos naturales puede favorecer la regulación de especies de plagas a largo plazo, teniendo en cuenta un apropiado manejo cultural de los agroecosistemas (descartando prácticas agrícolas destructivas e incrementando la diversificación de los sistemas de cultivo).

Los enemigos naturales, constituyen una de las principales opciones que promueve la regulación de plagas en el agroecosistema, debido a la interacción de ambos

organismos que se revela a través de complejas cadenas alimentarias, dónde unos dependen de otros para su subsistencia (Abdo y otros, 2008).

La relación natural entre huésped y parásito permite forjar las bases fundamentales del Control Biológico y, por lo tanto, la conservación de la biodiversidad. A mayor diversidad, mayor posibilidad de establecer equilibrio en menor lapso de tiempo. Cardona y otros (2005) citan experiencias exitosas con enemigos naturales (predadores, endoparasitoides y entomopatógenos) diversos sobre mosca blanca, tales como:

a) Los predadores, que pertenecen a los Órdenes: Coleoptera, Neuroptera, Hemiptera, etc., entre los que se destacan:

- *Delphastus pusillus* (Le Conte), (Coleoptera: Coccinellidae) tanto las larvas como los adultos de éste coccinélido consumen estados inmaduros de mosca blanca. Las larvas inicialmente son blancas y luego se tornan amarillas. El adulto es muy pequeño (1.65mm de longitud) y de color negro. Otros coccinélidos que pueden atacar a la mosca blanca son *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus), *Hippodamia convergens* (Guérin-Ménéville), *Coleomegilla maculata* (De Geer) y *Harmonia axyridis* (Pallas).

Agostini y otros (2005) señalan otros coleópteros como: *Eriopis connexa* (Germar), hemípteros como: *Cyrtopeltis notatus* (Distant) y *Anthocoridae* y *Geocoridae*.

- *Chrysoperla externa* (Hagen), (Neuroptera: Chrysopidae) la larva de éste neuróptero consume estados inmaduros y adultos de mosca blanca; puede ser de color gris o café y presenta mandíbulas a manera de pinzas. El adulto es pequeño (12 - 20mm de longitud) de color verde, con alas transparentes y antenas largas. Este predador está ampliamente distribuido.

- *Orius insidiosus* (Say), (Hemiptera: Anthocoridae) ninfas y adultos de ésta chinche consumen huevos y ninfas de mosca blanca. Las ninfas son pequeñas (2-3mm de longitud), sin alas, de color amarillo-naranja o café. Tienen forma de lágrima y son muy móviles. El adulto es aplanado y ovalado, pequeño (3mm de longitud), de color negro y con manchas blancas en las alas. Este predador también se encuentra ampliamente distribuido en distintas regiones.

b) Los endoparasitoides, del Orden de los Hymenópteros:

- *Amitus fuscipennis* (MacGown & Nebeker), (de la familia Platygasteridae) ataca ninfas de primer instar. Se trata de una avispa muy pequeña (0.77mm de longitud), de color negro. La ninfa de mosca blanca parasitada, inicialmente tiene un

aspecto lechoso y se torna gris oscura cuando el parasitoide está por emerger. Es uno de los enemigos naturales más importantes de *T. vaporariorum*.

- *Eretmocerus californicus* (Howard), (de la familia Aphelinidae) ataca ninfas de segundo y tercer instar. Es una avispa muy pequeña (1mm de longitud) y amarilla. Las ninfas parasitadas por *E. californicus* se tornan amarillas y adquieren un aspecto abultado cuando el parasitoide va a emerger.

- *Encarsia nigricephalla* (Dozier), (de la familia Aphelinidae) ataca ninfas del segundo instar, es una avispa muy pequeña (0.6mm de longitud), de cabeza negra y cuerpo amarillo. Cuando el parasitoide va a emerger, la ninfa parasitada por *E. nigricephalla* se torna amarilla con un punto negro en uno de los extremos de la ninfa.

Agostini y otros (2005) señalan algunos otros como: *Encarsia desantisi* (Viggiani), *E. formosa* (Gahan), las ninfas parasitadas por esta especie se oscurecen hasta quedar completamente negras, *E. porteri* (Mercet), *Eretmocerus paulistus* (Hempel), *Cales noacki* (Howard).

c) Entomopatógenos, en éste grupo resultan muy importante los Hongos como: *Lecanicillium lecanii* (Zimm), ataca adultos y ninfas. Los insectos afectados por *L. lecanii* se ven cubiertos de micelio blanco algodonoso. Otros hongos registrados son: *Paecilomyces fumosoroseus* (Bainier), *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, *Aschersonia aleyrodis* (Webber) y *Fusarium* (Link ex Fries).

1.5 Microorganismos entomopatógenos como reguladores de plagas

Los microorganismos entomopatógenos, son agentes que provocan enfermedad en los insectos. Dentro de este grupo se incluyen: bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoos (Badii y Abreu, 2006). Generalmente se caracterizan por su especificidad y escasa toxicidad sobre otros organismos del ambiente, por su aptitud para ser tratados industrialmente—se cultivan, formulan, empaquetan, almacenan y comercializan—como insecticidas convencionales, o por su fácil producción en forma artesanal o a pequeña escala (Badii y Abreu, 2006).

1.5.1 Los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos, naturalmente se encuentran en rastrojos de cultivos, estiércol, en el suelo o en las plantas. Los microclimas frescos, húmedos y con poca luminosidad favorecen el eficiente desarrollo de los mismos.

La mayor parte de los insectos son susceptibles a las enfermedades causadas por los hongos, de allí la importancia de éste grupo de entomopatógenos (López y Hans Börjes, 2001) y en muchos casos, han resultado ser biorreguladores de plagas muy eficientes, reduciendo así el uso de plaguicidas sintéticos (Pérez Consuegra, 2003). Actualmente se han descrito cerca de 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos. Entre los géneros más importantes se citan a *Metarhizium* (Sorokin), *Beauveria* (Vuillemin), *Aschersonia* (Montagne), *Entomophthora* (Fresenius), *Zoophthora* (Batko), *Erynia* (Nowakowski), *Eryniopsis* (Humber), *Akanthomyces* (Lebert), *Fusarium*, *Hirsutella* (Patovillard), *Hymenostilbe* (Petch), *Paecylomyces* (Bainier) y *Verticillium* (Nees) Wallroth (López y Hans Börje, 2001). En el caso de *Verticillium* y *Aschersonia* se trata de entomopatógenos específicos, mientras que los otros presentan un amplio espectro de hospedantes (como ácaros e insectos), tales como *Metarhizium* y *Beauveria*.

Existen numerosas razones que justifican el uso de hongos entomopatógenos como agentes reguladores de las moscas blancas. Estos hongos pueden cultivarse en medios artificiales y ser aplicados como insecticidas convencionales; siendo en muchos casos complementarios y compatibles con otros enemigos naturales.

Los hongos entomopatógenos demoran aproximadamente una semana en matar al insecto o al menos en que éste deje de alimentarse. Los insectos enfermos, no se alimentan y progresivamente manifiestan un cambio de color sobre el tegumento, debido a los metabolitos activos del hongo. El insecto muere y el signo del hongo se exterioriza, manifestando estructuras fructíferas y esporas, a través de las aperturas naturales del insecto (boca, ano, orificios de unión de los tegumentos y artejos) (Abdo y otros, 2008).

Lecuona (1992), destaca otras ventajas de los Entomopatógenos como reguladores de plagas:

- **Especificidad**, por ejemplo *Verticillium lecanii* es un hongo patógeno exclusivo de pulgones, *Nomuraea rileyi* (Maublanc) parasita larvas de noctuidos, y existen grados de mayor especificidad, otros muestran una especificidad a nivel de especie, tal es caso de una cepa francesa de *Beauveria bassiana* que resulta patógena a *Ostrinia nubilalis* (Hübner) mientras que otras resultan inocuas para este lepidóptero.

- **Multiplificación y dispersión natural**, los patógenos se multiplican y dispersan en el agroecosistema, posibilitando así su transmisión

generacional y un nivel de reducción natural de la plaga.

- **Control permanente**, si el patógeno logra introducirse y colonizar un agroecosistema perenne o semiperenne, puede mantener la población de la plaga en niveles económicamente tolerables.

1.5.2 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

El proceso de infección de los hongos comienza con la etapa de adhesión de la espora a la cutícula del hospedero. El contacto entre las unidades infectivas con el tegumento es un requisito indispensable para el establecimiento y continuación de la micosis (Lecuona, 1996). Una vez adherida e hidratada la espora, germina sobre el tegumento, emitiendo un tubo germinativo, para posteriormente penetrar al insecto. A veces se forma además un apresorio que puede ser útil para debilitar la cutícula en sus puntos de contacto (Lecuona, 1996). A través del mismo, el hongo comienza a excretar enzimas como las proteasas, quitinasas, lipasas y lipooxigenasas, que degradan la cutícula del insecto y coadyuvan con el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio (Pucheta Díaz, 2006). Una vez en el interior del insecto, el hongo se desarrolla como cuerpos hifales que se van diseminando a través del hemocèle e invaden diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, etc. ocasionando así la muerte del insecto (Pucheta Díaz, 2006). En el caso de los hongos patógenos, éstos producen micopesticidas (Kirk y otros, 2001), que son sustancias venenosas que en ciertos casos, pueden originar la muerte del insecto huésped. La muerte del insecto parasitado ocurre generalmente antes que el hongo colonice todo el interior del hemocèle. Ésta se produce, en parte, por la acción de las sustancias tóxicas secretadas por el hongo; y la muerte del hospedante marca el final de la fase parasítica para continuar creciendo saprofiticamente por todos los tejidos y compitiendo, en ciertos insectos, con la microbiota bacteriana intestinal (Lecuona, 1996). Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de nuevas esporas. Generalmente emerge por las regiones menos esclerotizadas del tegumento, como las membranas intersegmentales o los espiráculos, pero esto dependerá también del hospedante y de su estado de desarrollo (Lecuona, 1996).

Por último cabe destacar que, los factores que favorecen la dispersión de los

conidios o esporas, son el viento, el agua, el propio hombre y otros organismos.

1.6 Clasificación taxonómica de los hongos entomopatógenos

Según la clasificación taxonómica dada por el "Dictionary of Fungi" (Kirk y otros, 2001) los hongos entomopatógenos se encuentran en el reino Fungi cuyos 4 "phyla" son *Chytridiomycota*, *Zigomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*, así como en el reino Straminipila.

Los hongos entomopatógenos infectan a insectos de los siguientes órdenes: Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera. Tanto los estados inmaduros (ninfas o larvas) como los adultos pueden resultar más o menos susceptibles a las infecciones por hongos entomopatógenos (Lecuona, 1996).

1.6.1 Características de los hongos del "phylum" *Ascomycota*

Muchos miembros son imperfectos porque carecen de la fase sexual o bien ésta no se conoce. Estos anamorfos tienen reproducción asexual mediante la formación de conidios. Antiguamente se los ubicaba en el grupo artificial Deuteromycotina o Fungi Imperfecti por presentar anamorfos conidiales (Kirk y otros. 2001).

1.6.2 Características del genero *Beauveria* (Vuill) y especie *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin

El género *Beauveria* es un anamorfo de la familia *Clavicipitaceae* (Kirk y otros. 2001) y está compuesto por varias especies, por ejemplo: *B. bassiana*, *B. brongniartii* (De Lacroix) Siemszko, entre otras.

Beauveria se desarrolla en medios comunes como el Agar papa glucosado al 2%. Las colonias crecen pegadas al medio, su aspecto es aterciopelado o pulverulento.

Al comienzo el color es blanquecino, pero a medida que la colonia envejece se torna de color amarillo pálido, empezando por el reverso. La fructificación está constituida por células conidiógenas que forman conidios sucesivos en un raquis que se desarrolla en zigzag (proliferación simpodial del conidióforo). La esporulación puede ocurrir como sinema o coremio (conjunto de células conidiógenas unidas), o como células conidiógenas individuales, solitarias o dicotómicas. Las células conidiógenas pueden ser globosas, con un cuello muy corto, o pueden ser gruesas en la base y adelgazadas hacia el ápice, en forma de botella. Los conidios son globosos, globosos-elipsoidales y elipsoidales, miden mas o menos 3.5 µm de

diámetro (Humber, 1998) a veces con la base apiculada, tienen textura lisa. El raquis es zigzagueante y forma estructuras como apéndices muy cortos donde se insertan los conidios en forma sucesiva (Samson, 1988).

Sobre los cadáveres de insectos, *Beauveria spp.* presenta esporulación blanca a amarillo claro, aterciopelado a pulverulento, formando en algunos casos sinemas (Lomer y Lomer, 2001).

B. bassiana se encuentra en forma natural en suelos y sobre diversos órdenes de insectos (coleópteros, dípteros, heterópteros, lepidópteros, homópteros, tisanópteros) como también sobre ácaros tetránquidos, por lo que ha sido utilizado para el control de plagas de dichos órdenes en diversos países (Santamaría y otros, 1998).

CAPITULO 2. Del problema a la hipótesis

2.1. Fundamentación

La progresiva inquietud sobre la contaminación de los productos alimenticios con niveles altos de residuos tóxicos y de los abastecimientos de agua, por el uso de productos agroquímicos, así como el incremento de los costos y la disminución de la efectividad de los mismos, ha forjado la necesidad de buscar alternativas para disminuir las poblaciones de los insectos “plagas” de importancia agrícola.

En el marco de una mirada agroecológica de la agricultura, la alternativa de hongos entomopatógenos como reguladores de poblaciones de insectos en general y mosca blanca en particular, se ha evaluado en diversos lugares, con el consiguiente desarrollo de tecnología sustentable tanto ambiental, social como económico.

A nivel local no hay estudios específicos sobre las relaciones entre patógenos hospedantes y su integración con el ambiente, razón por la cual se justifica una investigación en este sentido.

2.2. Planteo del problema

El manejo de este “organismo perjudicial” se ha abordado, hasta ahora, mediante el uso de insecticidas químicos (Agostini y otros, 2005), lo que lejos de traer una solución al problema, ha desencadenado numerosas consecuencias negativas como: la selección de individuos resistentes, una creciente contaminación ambiental (Pérez Consuegra, 2003), riesgos de intoxicaciones directas a causa de la frecuencia de aplicación y características en la que se realizan (sin equipos, sin instrucciones, etc.); el surgimiento de plagas que hasta el momento tenían una importancia secundaria; la acumulación de residuos tóxicos en los productos hortícolas con el consiguiente riesgo para el consumidor.

Frente a esta realidad, se plantean dos preguntas de investigación:

¿Existen hongos entomopatógenos naturalmente asociados a poblaciones de moscas blancas?

¿Estos hongos, son potenciales biocontroladores, de manera tal que puedan constituir una alternativa para regular las poblaciones de moscas blancas, en cultivos hortícolas agroecológicos?

2.3. Hipótesis de trabajo

Como supuestos de la investigación se plantearon:

_Existen **reguladores biológicos -Hongos Entomopatógenos-** de poblaciones de moscas blancas, en sistemas ecológicos de producción hortícola en Jujuy.

_Los hongos entomopatógenos resultan una estrategia de regulación de las poblaciones de moscas blancas en hortalizas.

2.4. Objetivo general

✓ Contribuir a mejorar la sostenibilidad del agroecosistema hortícola, mediante el uso de reguladores biológicos de las poblaciones de mosca blanca (***Trialeurodes vaporariorum*** Westwood).

CAPITULO 3: Biología de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y su cría artificial.

Objetivo General

- Reconocer la biología del insecto, en los sistemas productivos locales.

Objetivos Específicos:

- Identificar las características morfológicas de cada uno de los distintos estadios de *T. vaporariorum*.
- Obtener colonias de *T. vaporariorum*, mediante la cría artificial del insecto.

3.1. INTRODUCCIÓN

Ante la hipótesis planteada, resultó necesario inicialmente, reconocer el insecto en cuestión, en base a la identificación de los caracteres morfológicos de la especie, aspectos a ser considerados posteriormente durante la cría artificial del insecto, para realizar finalmente los ensayos de control biológico que se detallaran en los capítulos siguientes.

Esta investigación se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología e invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Jujuy, localizado en la ciudad de San Salvador de Jujuy, departamento Dr. Manuel Belgrano. Ubicado a 20° 11'LS y 65° 17'LO.

3.2. Cría artificial de *T. vaporariorum*

3.2.1. Materiales y metodología

Invernadero

La cría se realizó en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias, está cubierto por plástico transparente tanto lateralmente como el techo. Con ventilación adecuada. Cuenta con los servicios de corriente eléctrica y agua. Durante la etapa de cría, se registraron diariamente las temperaturas máximas y mínimas, con un termómetro de máxima-mínima.

Jaulas de cría

Se utilizaron cinco “jaulas de cría”, facilitadas para este ensayo por la Cátedra de Zoología Agrícola, de la Facultad de Ciencias Agrarias. Cada jaula dividida en cuatro compartimentos de 78,5 x 40,5 x 40,5cm (Figura 3), dimensiones loables y sugeridas por Serra Colmar (1996) y recubiertas por tela voile.



Figura 3. Dos vistas de “jaulas de cría de moscas blancas”, en el invernadero de la facultad de Ciencias Agrarias de Jujuy.-

Plantas Hospederas

Se sembraron 2 semillas de tomate, de la variedad perita, por maceta. Utilizándose en cada una: tierra más sustrato. Se acondicionaron 2 macetas en cada compartimento de las jaulas, colocándose en lugares con exposición a la luz, respetándose así el fotoperíodo natural.

Insectos

En esta etapa se utilizaron los estadios NII-III y NIV, y adultos de *T. vaporariorum*, provenientes de una huerta orgánica. Los adultos de moscas blancas, fueron recolectados con un “tubo aspirador”, como se observa en la figura 4, de esta manera se evitó la contaminación de la cría artificial con otros insectos.



Figura 4. Recolección de moscas blancas con un aspirador bucal, sobre hojas de zapallito. Palma Sola.

Establecimiento y mantenimiento de *T. vaporariorum*, en el Invernadero

Cuando las plantas de tomate tenían de 20-30 días de post emergencia, se procedió a la infestación con adultos de *T. vaporariorum*, como se observa en la figura 5.

Para asegurar la pureza de la cría, los adultos se sometieron a una etapa de cuarentena. Estableciéndose el pie de cría.



Figura 5. Plantas de tomate infestadas con *T. vaporariorum*

Infestación de las jaulas

Se introdujeron adultos de *T. vaporariorum*, durante 3 días, en el interior de las jaulas para la postura de huevos. Luego se procedió a retirar los adultos, y evitar que continuaran ovipositando, para tener así una población homogénea, a fin de poder estudiar las características de cada uno de los estados del insecto y disponer del material para ensayos de control con hongos entomopatógenos. Posteriormente se separaron las plántulas en dos grupos de treinta cada uno, para los ensayos in vivo e in vitro.

3.2.2. Resultados

A partir de los diferentes pie de cría se logró, en las distintas jaulas, poblaciones homogéneas de cada estadio (figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 11). La observación bajo lupa binocular y microscopio de las hojas colonizadas, reveló las particularidades morfológicas de cada estadio ninfal. Constatando características como la coloración oscura de los huevos (una particularidad de la especie), en la cara abaxial de las hojas. Se observaron las NI translúcidas, ovales y móviles. Las NII-III ovales, translúcidas y fijas. Se observó al microscopio, en las ninfas NIV el orificio vasiforme lobado, típico de la especie, mediante la técnica de montaje con líquido de Hoyer.



Figura 6. Huevos oscuros de *T. vaporariorum* sobre hoja de tomate. 3X.



Figura 7. N I de *T. vaporariorum* sobre hoja de tomate. 3X.



Figura 8. N II de *T. vaporariorum* sobre hoja de hoja de tomate. 1X.



Figura 9. N III *T. vaporariorum* sobre hoja de hoja de tomate. 1X.



Figura 10. N IV de *T. vaporariorum* sobre hoja de hoja de tomate. 3X.



Figura 11. Adulto de *T. vaporariorum* sobre hoja de hoja de tomate. 3X.

3.2.3. Discusión

Las observaciones de las características morfológicas y aspectos cualitativos particulares de cada estadio de *T. vaporariorum* coincidieron con las descritas por Hill (1969) y Agostini y otros (2005).

3.2.4. Conclusión

Se logró reconocer e identificar las características morfológicas de cada estadio de *T. vaporariorum*. Así mismo se logró obtener poblaciones homogéneas de los distintos estadios del insecto (a través de la cría artificial), para los ensayos posteriores.

CAPITULO 4: Muestreos a campo de insectos, aislamiento y selección de hongos entomopatógenos de moscas blancas.

Objetivos Generales:

- Reconocer y diferenciar los distintos modelos productivos.
- Reconocer agentes reguladores de poblaciones de moscas blancas.
- Buscar hongos entomopatógenos asociados a mosca blanca.

Objetivos Específicos:

- Realizar muestreos en dos zonas hortícolas de Jujuy, con diferentes sistemas de producción, convencional y agroecológica, de moscas blancas en los distintos estadíos, vivos y muertos.
- Reconocer enemigos naturales de *T. vaporariorum*.

4.1. INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo, se describen los lugares seleccionados para el muestreo, la metodología empleada para la toma de muestras a campo de mosca blanca según Serra Colmar (1996). Posteriormente se detalla el trabajo de laboratorio, que consistió en el aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos, naturalmente asociados a mosca blanca.

4.1.1. Caracterización de los ambientes muestreados

La localidad de Aguas Calientes se encuentra ubicada en el Departamento de El Carmen, y se caracteriza por ser una de las zonas hortícolas más importante de la provincia. La finca muestreada manifiesta las características propias de un lugar cuyo enfoque coincide con el marco de un manejo productivo convencional, ya que se observó un sistema simple, la implementación de monocultivo, entre los insumos empleados se citan fertilizantes sintéticos, control químico de plagas, etc.

La localidad de Palma Sola, ubicada en el Departamento de Santa Bárbara, es también una región productiva, muy importante dentro de la provincia. Son comunes los sistemas productivos convencionales, aunque hay productores que se han avocado a la producción agroecológica. La finca muestreada aquí,

reveló un enfoque más coincidente con un modelo agroecológico, ya que se evidenció un manejo sustentable del sistema, a través de la utilización de fertilizantes orgánicos, reciclado de nutrientes, la implementación de policultivos, control biológico de plagas, etc.

Una síntesis de la caracterización de los ambientes hortícolas muestreados, se presenta en el siguiente cuadro, el que se estructuró de acuerdo al análisis de Sarandón (2002).

Modelo de agricultura convencional:	Modelo Agroecológico
Muestreo en localidad de Aguas Caliente	Muestreo en localidad de Palma Sola
ENFOQUE	
Reduccionista. Falta de una óptica sistemática. Importancia de los componentes. Reducción o mala definición de los límites del sistema.	Holístico. Empleo de una óptica sistemática. Importancia de las interrelaciones. Ampliación y redefinición de los límites del sistema.
OBJETIVOS	
A corto plazo. Concepto productivista. Énfasis en el rendimiento. No incorporación del costo ambiental. Sistemas simples, baja diversidad (alta inestabilidad).	A largo plazo. Concepto sustentable. Énfasis en el agroecosistema y ecosistemas relacionados. Incorporación del costo ambiental. Sistemas complejos, alta diversidad (alta estabilidad). Biodiversidad como sistema de cultivo.
TÉCNICAS	
Fertilizantes sintéticos. Uso intensivo del suelo. Agricultura permanente. Monocultivos. Control químico de plagas.	Fertilizantes orgánicos. Reciclado de nutrientes. Uso conservacionista del suelo. Rotación de cultivos-praderas. Policultivos. Manejo de la biodiversidad para el control de plagas. Conservación de la biodiversidad <i>in situ</i> .

4.2. Muestreos a campo en dos ambientes con manejos productivos diferentes

4.2.1. Materiales y metodología

Se realizaron monitoreos quincenales, en ambas zonas hortícolas de Jujuy, con sistemas de producción diferentes, **convencional** en la localidad de Aguas Calientes y **agroecológica** en la localidad de Palma Sola.

En Aguas Calientes, se monitoreó una finca (figura 12) de producción hortícola, dónde se cultiva únicamente pimiento y tomate.



Figura 12. Finca de Parra Pardo. Producción hortícola convencional. Aguas Calientes

En Palma Sola, se monitoreó una quinta, con una mayor diversidad de especies cultivadas (tomate, zapallito, pimiento, repollo y perejil). Los monitoreos y la técnica de muestreo aplicada fue la misma en ambas zonas.

De acuerdo a la técnica de muestreo sugerida por Serra Colmar (1996), se eligieron lotes en los que se establecieron cuatro puntos de muestreos al azar. El muestreo consistió en la revisión de los tercios medio y superior de diez plantas, recolección de adultos muertos de *T. vaporariorum* (para hallar asociaciones con hongos entomopatógenos) y captura de enemigos naturales (para su posterior identificación en laboratorio). También se recolectaron hojas de tomate, pimiento y zapallito infestadas con formas juveniles y adultos vivos y muertos de *T. vaporariorum*. Las mismas fueron colocadas en bolsas y en cajas de petri plásticas. Los individuos muertos, fueron colectados separadamente, como también los posibles enemigos naturales de *T. vaporariorum*.

Los adultos vivos de *T. vaporariorum* fueron capturados mediante el uso de un tubo aspirador bucal.

Acondicionamiento de los cadáveres, en laboratorio

Los adultos muertos recolectados, fueron colocados en cámaras húmedas, previa desinfección externa (Lecuona, 1996), durante 1 semana a 24°C, para determinar la presencia de hongos entomopatógenos asociados naturalmente. La técnica de desinfección externa del insecto, consistió en sumergir los cadáveres durante 30 segundos en una solución de alcohol 70%. Para luego lavarlos en agua destilada durante 1 minuto. Finalmente los individuos se colocaron sobre toallas de papel secante para escurrir el exceso de agua (Ramos y otros, 2000). Este procedimiento disminuye el riesgo de contaminación con hongos saprobios.

Las muestras se acondicionaron en cámaras húmedas. Esta etapa consistió en colocar a los insectos sobre trozos de papel de filtro, en el interior de cajas de petri conteniendo un trozo de algodón humedecido con agua destilada estéril (todos los instrumentos empleados se esterilizaron previamente, para evitar la contaminación), e incubados a 24°C.

El procesamiento de las muestras fue el mismo para ambas zonas muestreadas.

Aislamiento y cultivo

En los casos en que el insecto manifestó signos de micosis (esporulación y micelio), se procedió al aislamiento y cultivo del mismo en cajas de petri con agar papa glucosado 2%), incubadas a 25 °C.

Observación al microscopio

Se realizaron dos técnicas de montaje en portaobjetos para la observación al microscopio óptico, las mismas se detallan a continuación .

1) ¹Se tomó con una pinza histológica, una porción de cinta adhesiva de 2cm², la parte adherente de la cinta se afirmó suavemente sobre una porción de la colonia y luego se colocó sobre el porta-objetos con una gota de azul de algodón en lactofenol y se observó al microscopio.

2) El otro procedimiento, consistió en tomar una pequeña muestra de la colonia con una aguja histológica y transferirlo a un portaobjetos con una gota de azul de algodón en lactofenol cubriendo con cubreobjeto. Para el reconocimiento y caracterización se utilizaron claves taxonómicas como las de Alves, S. (1998), Humbert (1998) y Samson y otros (1998).

¹ Metodología desarrollada por la Lic. Julieta Posadas. IMYZA. INTA Castelar. Adquirida durante una pasantía realizada en IMYZA a cargo del Dr. Lecuona.

4.2.2. Resultados

A campo:

Con respecto al reconocimiento y diferenciación de ambientes, en Aguas Calientes se advirtió sobre los cultivos una población de moscas blancas más importante que en Palma Sola.

En el relevamiento de organismos benéficos realizado en el primer sitio, se hallaron larvas de Díptero Sírfido (devorando adultos de moscas blancas) sobre hojas de pimiento (figura 13) y huevos de crisópidos.



Figura 13. Dos vistas de larva de Díptero Sírfido devorando adulto de mosca blanca, sobre hojas de pimiento

Mientras que en Palma Sola, se observaron ejemplares de coleópteros predadores (Coccinélidos) y estados juveniles y adultos de neurópteros (crisópidos). (figuras 14)



Figura 14_a. *Cycloneda* sp.



Figura 14_b. *Hippodamia* sp.



Figura 14_c. *Eriopis* sp.



Figura 14_d. *Crysoperla* sp.

Figuras 14 a, b, c y d. gentileza de la Ing. Silvia Tapia, JTP en la cátedra de Zoología Agrícola FCA UNJu.

En laboratorio:

Detección de Entomopatógenos

Con respecto a la presencia de entomopatógenos en las muestras de Aguas Calientes, luego de los siete días, los cadáveres sometidos a condiciones de humedad, solo evidenciaron hongos saprobios, tales como *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., y *Alternaria* sp., no así la presencia de hongos entomopatógenos asociados.

En las muestras de Palma Sola, los cadáveres de mosca blanca, sometidos a incubación por una semana, manifestaron signos de micosis. Mediante la observación microscópica y la ayuda de claves taxonómicas, se identificó al hongo *Beauveria bassiana*.

Las dos técnicas adoptadas para la observación de los hongos, fueron efectivas. De esta manera se pudo distinguir las estructuras del hongo, conidios, etc. teñidas de azul.

Se aisló y conservó el hongo *Beauveria bassiana* asociado naturalmente a adultos de *T. vaporariorum* (figura 15) para los bioensayos.



Figura 15. Imagen de un adulto de *T. vaporariorum* colonizado por *B. bassiana*

4.2.3. Discusión y Conclusión

El ser sólo dos las especies cultivadas (familia solanácea), en la zona muestreada de Aguas Calientes, evidencia de una baja diversidad y un agroecosistema más alterado, aspecto éste confirmado por Altieri y otros (2000). A su vez, el manejo productivo que incluye el uso de agroquímicos, es otro factor que incide sobre la población de los enemigos naturales de la mosca blanca, así lo mencionan autores como McLaughlin y Pierre (1995) y Silva y otros (2000), quienes sostienen que los pesticidas impactan negativamente sobre la diversidad de la fauna benéfica, resaltando que la toxicidad de los insecticidas causa la reducción en la abundancia y diversidad de polinizadores.

La quinta orgánica muestreada en Palma Sola, muestra un sistema que promueve entre otras cosas la biodiversidad, previendo recursos tales como el polen, néctar, presas alternativas, refugios, etc., generando condiciones óptimas para el desarrollo de enemigos naturales. Otros autores como Altieri (1999), sostiene además la importancia y el rol ecológico de la biodiversidad en el sistema

agrícola.

En este marco entonces fue posible hallar al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Rodríguez Dos Santos y Del Pozo Nuñez (2003) también aislaron al género *Beauveria* naturalmente asociado a *T. vaporariorum*.

En los sistemas de producción agroecológicos pareciera existir una mayor diversidad de reguladores biológicos de poblaciones de moscas blancas, (como predadores y hongos entomopatógenos).

Capítulo 5: Caracterización de *Beauveria bassiana*

(Bálsamo) Vuillemin de la zona hortícola de Jujuy.

Objetivo general:

- Reconocer las características macroscópicas y microscópicas de cepas de *B. bassiana* de la zona hortícola de Jujuy.

Objetivos específicos:

- Aislar, cultivar y caracterizar a *B. bassiana*.
- Reactivar cepas nativas de *B. bassiana*, disponibles en el laboratorio de fitopatología.
- Realizar valoraciones biológicas in vitro de *B. bassiana*.

5.1. Introducción

En esta sección del trabajo, se profundiza la identificación del hongo entomopatógeno *B. bassiana* hallado naturalmente asociado a mosca blanca en la zona hortícola de Palma Sola, y la caracterización a través de la biovaloración de parámetros importantes en la potencialidad de un aislamiento para su posterior producción como: la producción de conidios, el crecimiento radial de la colonia y el tiempo medio de germinación.

5.2. Aislamiento de *B. bassiana*

5.2.1. Materiales y metodología

Los cadáveres de *T. vaporariorum* recolectados en campo, recibieron un tratamiento de desinfección externa, luego fueron incubados en cámaras húmedas. Finalmente se procedió al aislamiento del hongo, en cámara de flujo laminar. Con una aguja histológica, se tomó muestras del hongo esporulado sobre el cadáver, se sembró en cajas de petri con medio de cultivo Agar papa dextrosa 2% (APG 2%). Luego se incubó a 24°C con fotoperíodos de 12 horas de luz/oscuridad, durante 14 días. Se realizaron repiques en APG 2% para la caracterización macroscópica y microscópica de la colonia.

En la observación macroscópica de la colonia sobre APG 2%, se consideraron aspectos como: color, borde, pigmentación del medio y características de la esporulación (aspecto y consistencia).

Para la caracterización microscópica, se realizaron preparados microscópicos utilizando para el montaje azul de algodón en lactofenol, para facilitar la observación. Se utilizó un microscopio óptico binocular con el que se observaron características morfológicas: tipo de micelio, coremios, conidióforos y conidios. Se utilizó bibliografía y claves de apoyo (Alves, 1998; Humber, 1998; Samson y otros, 1988).

5.3. Reactivación de cepas nativas conservadas en el laboratorio de Fitopatología

Se realizó la reactivación de una cepa de *B. bassiana* aislada de larvas de lepidóptero sobre un cultivo local de soja (Bb007), que en bioensayos anteriores mostró un 75% de mortandad de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick). Tal práctica resulta importante dado que los repiques sucesivos en medios artificiales o la conservación durante largos períodos, incide en una disminución de la virulencia del entomopatógeno.

Reactivación sobre pupas de *T. vaporariorum*.

Se realizó un repique de la cepa Bb007 conservado a 4°C sobre APG 2%. Con la colonia obtenida se preparó una suspensión de 10^8 conidios/ml, pulverizándose hasta goteo hojas de tomate infestadas con ninfas NIV, provenientes de la cría artificial en el invernadero. Inmediatamente después de escurridas las hojas, fueron colocadas en cajas de petri sobre agar agua e incubadas a 24°C, por 7 días. Procedimiento similar a los utilizados por Vargas Flores (2003).

5.4. Biovaloraciones in vitro de las cepas nativas

La valoración biológica, se realizó con la cepa reactivada Bb007 y la cepa aislada de mosca blanca sobre zapallito de tronco en la localidad de Palma Sola Bb008.

En esta etapa se consideraron los siguientes parámetros: (Lecuona y otros, 2001).

- a) Determinación del tiempo medio de germinación (TG_{50})
- b) Determinación del crecimiento radial de colonias.
- c) Producción de conidios por colonia.

5.4.1. Determinación del tiempo medio de germinación (TG_{50} = tiempo para que germine el 50% de los conidios)

Se sembraron sobre portaobjetos excavados, con APG 2%, 25 microlitros de una suspensión conidial y se colocó un cubreobjetos. Las placas se colocaron en

cajas de petri e incubaron en estufa a 24 +/- 1°C.

La germinación fue considerada cuando los conidios tenían un tubo germinativo igual o mayor al diámetro del conidio.

El conteo de conidios germinados se inició a las 14 horas de siembra, a intervalos de 2 horas. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento (Bb007 y Bb008) y 100 observaciones (conidios) por repetición. Se estimó las diferencias entre los TG₅₀ de ambas cepas a las 14 hs con el programa Infostat (Tukey $\alpha= 0,05$).

5.4.2. Determinación del crecimiento radial de colonias

Se transfirió en el centro de la caja de Petri, con APG 2%, un cubo de 0.25 cm² de la colonia pura de Bb007 y Bb008. Las cajas se incubaron a 24 +/- 1°C. Se realizaron 2 mediciones, a los 9 y 14 días. Se promedió el diámetro mayor y menor de cada colonia, y se calculó el radio.

Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, bajo un diseño completamente aleatorizado, se realizó un análisis de varianza mediante el programa Infostat.

5.4.3. Producción de conidios por colonia

Luego del cálculo de crecimiento radial de la colonia, los conidios de cada repetición, fueron transferidos a un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril más Tween 80 al 0.2% (este producto facilita la separación de los conidios). Se agitó con un vortex y se realizó diluciones, (debido a la dificultad en el conteo y riesgo de error por elevada concentración de esta solución madre). Para ello con la ayuda de una pipeta, se tomó 1 ml de la solución madre, y se transfirió a un tubo con 9 ml de agua destilada estéril más tveen (10²). Se agitó durante 1 minuto y se realizó una segunda dilución (10³) a partir de la cual se procedió a realizar los conteos. La cantidad de conidios por colonia fue estimada usando un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, bajo un diseño completamente aleatorizado, los datos se analizaron con el programa Infostat.

Para calcular la concentración de la suspensión madre se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

5.5. Resultados

5.5.1. Aislamiento y cultivo del hongo

Se aisló al hongo entomopatógeno asociado naturalmente a mosca blanca y, se obtuvieron de allí las colonias características.

Se pudo observar otros microorganismos fúngicos asociados a distintos estadios del insecto, tales como: *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* y *Alternaria sp.*

Caracterización macroscópica de la colonia.

Medio de cultivo: APG 2%. Tiempo: 14 días

Aspecto: Formación mas o menos densa.

Diámetro: 5,5 cm

Color del anverso: Blanco.

Color del reverso: Blanco amarillento.

Pigmentación: Amarilla.

Superficie: Semi-elevada

Consistencia: aterciopelada y en algunos casos pulverulenta.

En la figura 16 se puede observar una colonia de *B. bassiana*, vista anverso y reverso.

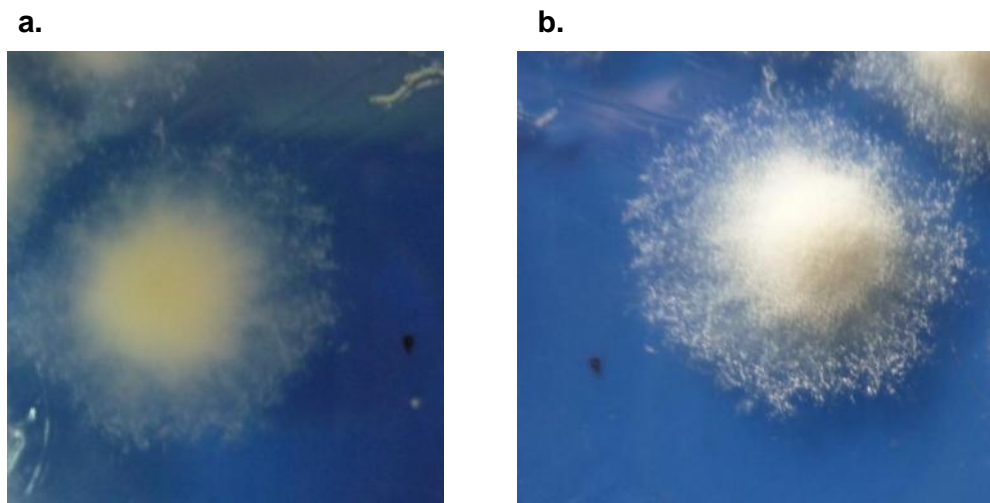


Figura 16. Fotografía macroscópica de la colonia de *B. bassiana*: **a.** Vista reverso, **b.** Vista anverso

Caracterización microscópica de *B. bassiana*

Formaciones: Sinemas (inconstante).

Aspectos del conidióforo: Sencillos, agrupados densamente, base globosa, adelgazándose hacia la porción que sostiene al conidio (formando raquis) y se presenta en forma de zig- zag.

Aspectos del conidio: Hialinos, redondeados, globosos y unicelulares. Un conidio en el ápice de cada raquis.

La Figura 17 muestra una imagen al microscopio óptico (100 X).

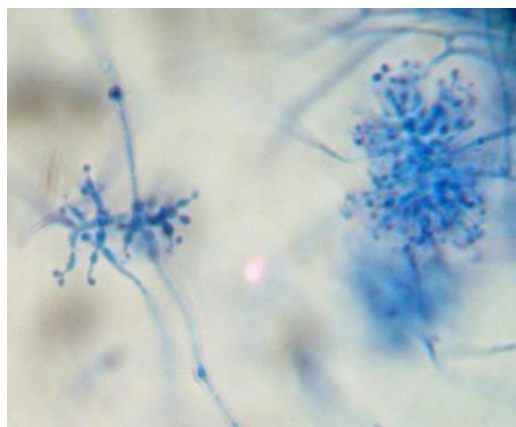


Figura 17: Fotografía microscópica de *B. bassiana*

5.5.2. Reactivación de la cepa Bb007

La técnica aplicada para reactivar la cepa de *B. bassiana* (Bb007), conservada en el laboratorio de Fitopatología, resultó satisfactoria, al cabo de 7 días del tratamiento se observaron signos de la enfermedad sobre las ninfas N IV de *T. vaporariorum* parasitadas.

Biovaloraciones de Bb007 y Bb008

5.5.3. Tiempo medio de Germinación (TG₅₀)

Como se puede observar en la Tabla 1, el TG₅₀ para la cepa Bb008 fue a las 16hs, mientras que para la cepa Bb007 fue a las 14hs 24' de siembra, este valor se obtuvo mediante una interpolación de datos. En el gráfico 1, se observa que ambas cepas tienen un comportamiento similar en cuanto a este parámetro, aunque Bb007 presenta porcentajes de germinación ligeramente superiores al de Bb008. El análisis estadístico con el programa Infostat no reveló diferencias significativa entre ambas cepas, para la germinación de conidios a las 14hs, Tukey = 0,05.

Tabla 1: Tiempo medio de germinación en ambas cepas

TG ₅₀ en horas		
HDS*	Bb007	Bb008
14HS	48	38
16HS	57	50
19HS	61	60
22HS	78	74
24HS	97	90

*horas después de la siembra.

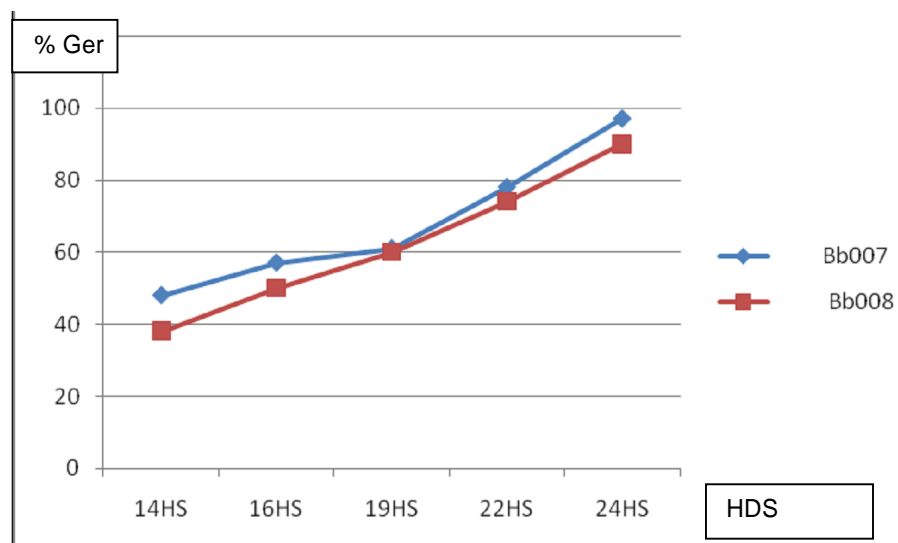


Grafico 1: Porcentaje de germinación de Bb007 y Bb008 in vitro en medio agarizado durante 24 horas.

5.5.4. Crecimiento Radial de la Colonia

En la Tabla 2, se presentan los datos obtenidos del crecimiento radial de las colonias. El crecimiento radial medio a los 9 días de siembra fue de 2,75cm para Bb007 y 2,25cm para Bb008. A los 14 días de siembra la media registrada fue de 3,33cm para Bb0087 y 2,75cm para Bb008.

Tabla 2: Crecimiento radial de colonia

Medición en cm del Crecimiento Radial de la Colonia		
LDS*	Bb007	Bb008
9 Días	R ₁ 3cm	R ₁ 2,25cm
	R ₂ 2,5cm	R ₂ 2,25cm
	R ₃ 2,75cm	R ₃ 2cm
	: 2,75cm	: 2,25cm
14 Días	R ₁ 3,5cm	R ₁ 2,75cm
	R ₂ 3,25cm	R ₂ 3,25cm
	R ₃ 3,25cm	R ₃ 2,25cm
	: 3,33cm	: 2,75cm

*Lectura Días después de la Siembra.

No se registraron diferencias significativas entre Bb007 y Bb008, en cuanto al crecimiento radial de colonias en ambas lecturas.

5.5.5. Producción de conidios por colonia

En la Tabla 3, se observa una importante producción de conidios en ambas cepas, después de 14 días de siembra. La producción media de conidios registrada para Bb007 fue de $3,63 \times 10^7$ y de 5×10^7 conidios/ml para Bb008. Estadísticamente no se registraron diferencias significativas en cuanto a la producción de conidios entre las cepas.

Tabla 3: Recuento de conidios para cada cepa a los 14 días de siembra

Bb007	Bb008
R ₁ $4,8 \times 10^7$	R ₁ $7,1 \times 10^7$
R ₂ $2,6 \times 10^7$	R ₂ $2,4 \times 10^7$
R ₃ $3,5 \times 10^7$	R ₃ $5,6 \times 10^7$
: $3,63 \times 10^7$: 5×10^7

5.6. Discusión

La cepa nativa Bb008 presentó características macro y microscópicas que coinciden con las descritas por Alves (1998) y Samson (1998) para el género *Beauveria*, las dimensiones de los conidios de la cepa Bb008, coinciden con las descripciones de Humbert (1998) para la especie *Beauveria bassiana*. Al microscopio se observaron estructuras alargadas y ramificadas, conocidas como sinemas o coremios, reportadas por Vargas (2003), para la especie *B. bassiana*. Los autores Pariona y otros (2007), Samson y otros (1988), Rodríguez Dos Santos y Del Pozo Núñez (2003); sugieren que estas estructuras son eficientes para la dispersión de conidias, lo cual indica que estas cepas serían buenos controladores en el campo.

Las dos cepas produjeron pigmentación amarilla difundiéndose en el medio, lo que evidencia la presencia de beauvericina, una toxina secretada durante el crecimiento del hongo, estos resultados son coincidentes a los obtenidos por Pariona y otros (2007).

Ambas cepas Bb007 y Bb008, presentaron valores de viabilidad superiores al 98% luego de las 24hs de incubación a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, coincidente a los valores obtenidos por Lecuona y otros (2001).

Los resultados obtenidos en la biovaloración de ambas cepas (crecimiento radial y producción de conidios) a los 9 días, son coincidentes a los obtenidos por Lecuona (2001).

La reactivación de la cepa Bb007, produjo resultados comparables a los obtenidos por García González y otros (2001) y Alcalá de Marcano y otros (1999) en la reactivación de cepas.

5.7. Conclusión

Se logró aislar, cultivar y caracterizar macro y microscópicamente cepas de *B. bassiana*, asociada naturalmente a *T. vaporariorum*. Además se logró reactivar las cepas nativas de *B. bassiana* disponibles en el laboratorio de fitopatología. Ambas cepas de *B. bassiana* (Bb007 y Bb008) son satisfactorias en cuanto a sus valoraciones biológicas, por lo que serían potencialmente eficientes para una multiplicación masiva.

Capítulo 6: Bioensayos in vitro sobre ninfas N II-III y N IV

Objetivo general:

- Realizar ensayos con las cepas Bb007 y Bb008, para evaluar los niveles de mortandad sobre ninfas N II-III y N IV de *T. vaporariorum* en hojas desprendidas de plantas de tomate, bajo condiciones controladas de laboratorio.

Objetivos específicos:

- Determinar el $TL_{50\%}$ y el TMS.
- Evaluar los niveles de mortandad en las N II-III de *T. vaporariorum*, con las cepas Bb007 y Bb008.
- Evaluar los niveles de mortandad en las N IV (pupas) de *T. vaporariorum*, con las cepas Bb007 y Bb008.

6.1. Introducción

Seleccionada y evaluada la potencialidad de las cepas Bb007 y Bb008 para la multiplicación masiva, el paso siguiente consiste en evaluar su capacidad patogénica de las mismas en ensayos in vitro, bajo condiciones de laboratorio controladas, donde el efecto de los tratamientos cuenta con una única variable de respuesta (mortandad del insecto) y un control de variables extrañas.

6.2. Determinación del tiempo de letalidad al 50% ($TL_{50\%}$) y tiempo medio de sobrevivencia (TMS)

6.2.1. Materiales y metodología

Para la determinación del $TL_{50\%}$ y TMS, se tomaron hojas de tomate provenientes de la cría artificial de N IV de *T. vaporariorum*. En el interior de la cámara de flujo laminar, las hojas infestadas fueron sumergidas durante sesenta segundos en una suspensión de 10^8 conidios/ml, este procedimiento se realizó con ambas cepa Bb007 y Bb008, utilizándose agua destilada para el testigo. Luego las hojas se colocaron sobre papel secante, para eliminar el exceso de agua, y se transfirieron a cajas de petri con agar agua 2%, e incubadas a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y una fotofase de doce horas, durante siete días.

La mortalidad fue observada diariamente para determinar el tiempo en el que muere el 50% (TL_{50%}) de la población de ninfas N IV, por la acción de las cepas de *B. bassiana*. Los datos se registraron en una tabla de frecuencias, donde se expreso la mortandad acumulada durante 7 días. Para la determinación del TL_{50%} se utilizó una interpolación lineal de la mortalidad diaria acumulada.

Se determinó el tiempo medio de sobrevivencia (TMS) para la población expuesta a cada cepa, aplicándose la siguiente fórmula (Lomer y Lomer, 2001): donde n_t es el número de individuos que muere en un día t , del total de la población N de insectos tratados, entre el día **uno** y el último día del ensayo.

$$TMS(t) = \frac{\sum_{t=1}^n n_t x(t - 0,5)}{N}$$

Se realizó el análisis de curvas de Kaplan-Meier, el cual permite estudiar la sobrevida de entidades en función de una variable independiente dicotómica (viva o muerta), mediante el programa Infostat.

6.3. Bioensayos sobre N II-III y N IV in vitro, sobre hojas desprendidas de tomate

6.3.1 Materiales y metodología

Para la realización de los ensayos de niveles de mortandad de *T. vaporariorum* in vitro, se tomaron hojas de tomate, provenientes de la cría artificial del insecto, con ninfas N II-III. En el interior de una cámara de flujo laminar, las hojas infestadas fueron sumergidas durante sesenta segundos en una suspensión de 10⁸ conidios/ml, este procedimiento se realizó con ambas cepa del hongo *B. bassiana*, utilizándose agua destilada para el testigo. Luego las hojas se colocaron sobre papel secante, para eliminar el exceso de agua, y se transfirieron a cajas de petri con Agar agua 2%, e incubadas a 24 + o - 1°C y una fotofase de doce horas, durante siete días (figura 18).



Figura 18. N II-III y IV incubadas a 24+o- 1°C.

El mismo procedimiento se siguió con hojas infestadas con N IV.

Las evaluaciones se realizaron a los siete días, con la asistencia de una lupa binocular. En esta evaluación se consideró el número total de ninfas muertas con presencia del signo de la enfermedad o los siguientes síntomas: ninfas rojas, rosadas y/o blancas. A los individuos con ésta sintomalogía, se los separó para corroborar la muerte por *B. bassiana*, colocándolos en cámara húmeda, para favorecer el desarrollo del hongo.

Se siguió un diseño completamente aleatorizado de tres tratamientos, cinco repeticiones para N II-III y N IV. Los datos se analizaron con el programa Infostat (Tukey $\alpha= 0,05$).

6.4. Resultados

6.4.1. Determinación del TL50%

En las tablas 4 y 5 se observan los registros de mortandad diaria y acumulada de N IV de *T. vaporariorum* expuestas a Bb007 y Bb008 respectivamente desde el tercer día de aplicación al séptimo día. A los siete días del tratamiento, las N IV expuestas a Bb007 presentan una FRA de 96,7%, mientras que las expuestas a Bb008 presentan una FRA de 98,9%. No se observó mortandad en el testigo por *B. bassiana*, lo que demuestra que no hubo contaminación desde los otros tratamientos.

Tabla 4: Mortandad diaria acumulada de ninfas N IV expuestas a Bb007

Día	3	4	5	6	7
R1	9	17	20	22	27
R2	14	20	25	28	30
R3	11	15	24	25	29
R4	13	22	26	29	30
R5	14	19	21	23	28
R6	14	20	22	25	30
Media de FAA ¹	12,5	18,8	23	25,3	29
Media de FRA ²	41,7	62,8	76,7	84,4	96,7

¹ Frecuencia absoluta acumulada.

² Frecuencia relativa acumulada.

Tabla 5: Mortandad acumulada de N IV expuestas a Bb008

Día	3	4	5	6	7
R1	15	17	27	29	30
R2	8	10	20	24	30
R3	18	22	25	27	30
R4	10	18	25	27	30
R5	16	21	23	26	30
R6	9	20	24	26	28
Media de FAA ¹	12,7	18	24	26,5	29,6
Media de FRA ²	42,2	60	80	88,3	98,9

¹ Frecuencia absoluta acumulada.

² Frecuencia relativa acumulada.

En el gráfico 2 se han representado las frecuencias relativas acumuladas para ambas cepas y el TL_{50%}. Las dos cepas presentan un efecto similar sobre las N IV.

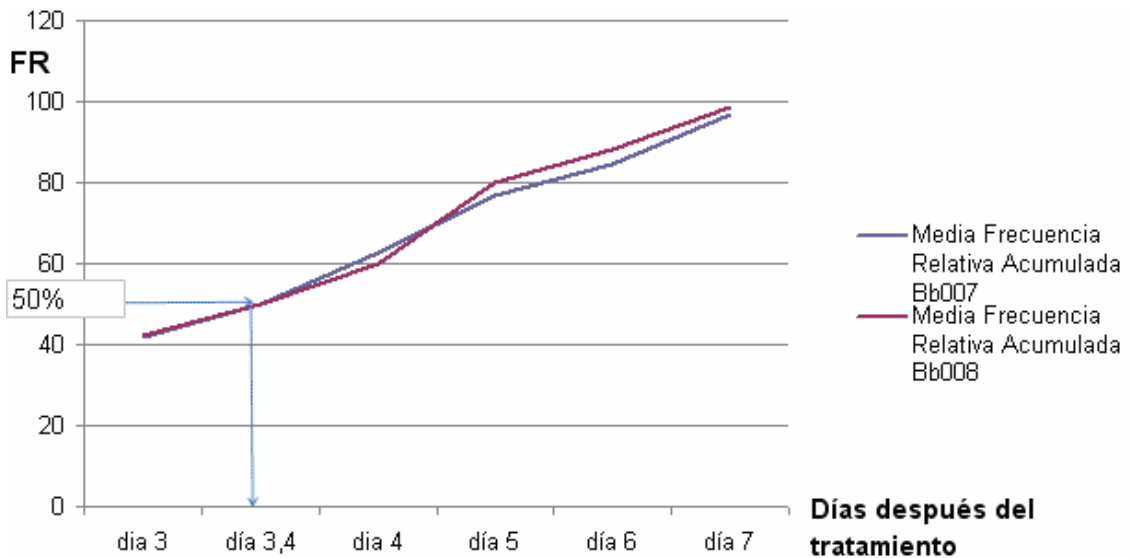


Gráfico 2. Frecuencia relativa acumulada a los 7 días del tratamiento y determinación del TL_{50%}

Mediante la interpolación lineal de la mortalidad diaria acumulada, el TL_{50%} para N IV fue de 3,44 días para ambas cepas.

6.4.2. Determinación del TMS

El TMS de N IV expuestas a Bb007 fue de 3,78 días (CV 13,2) y para las N IV expuestas a Bb008 de 3,73 días (CV 28,5), no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos.

En la tabla 6 se presenta el análisis de sobrevida de Kaplan-Meier, de las N IV expuestas a Bb007 y Bb008. Y la tabla 7 el detalle de la estadística descriptiva del mismo.

De las 900 NIV expuesta a Bb007, al tercer día se registró un porcentaje del 92% de sobrevida y al séptimo día del 29%. De las 900 NIV expuestas a Bb008, al tercer día se registró un porcentaje del 92% de sobrevida y al séptimo día del 28%.

Tabla 6: Análisis de Sobrevida de Kaplan-Meier

tratamiento Logrank Test - Chi Cuadrado=0,189 p=0,663814

tratamiento	Caso	Tiempo	Expuestos	Muertos	Sobrevida	Error Estándar
Bb007	180	3	900	75	0,92	0,01
Bb007	360	4	825	113	0,79	0,01
Bb007	540	5	712	138	0,64	0,01
Bb007	720	6	574	152	0,47	0,01
Bb007	900	7	422	159	0,29	0,01
Bb008	180	3	900	76	0,92	0,01
Bb008	360	4	824	108	0,80	0,01
Bb008	540	5	716	144	0,64	0,01
Bb008	720	6	572	157	0,46	0,01
Bb008	900	7	415	165	0,28	0,01

Tabla 7: Estadística descriptiva del análisis de de Sobrevida de Kaplan-Meier

tratamiento	dia	Variable	n	Media	D.E.	CV
Bb007	3	sobrevida	180	0,42	0,49	118,65
Bb007	4	sobrevida	180	0,63	0,48	77,22
Bb007	5	sobrevida	180	0,77	0,42	55,32
Bb007	6	sobrevida	180	0,84	0,36	43,04
Bb007	7	sobrevida	180	0,88	0,32	36,44
Bb008	3	sobrevida	180	0,42	0,50	117,31
Bb008	4	sobrevida	180	0,60	0,49	81,88
Bb008	5	sobrevida	180	0,80	0,40	50,14
Bb008	6	sobrevida	180	0,87	0,33	38,38
Bb008	7	sobrevida	180	0,92	0,28	30,24

No hay diferencias significativas entre ambas cepas, observándose que a medida que avanzamos en el tiempo de ensayo los valores que toma el CV disminuyen, llegando a valores aceptables a los 7 días, corroborándose que dicho período es aceptable para la obtención de datos sobre los niveles de mortandad en ensayos de patogenicidad.

Como se puede observar en el gráfico 3, de curvas de sobrevida de Kaplan-Meier, ambos tratamientos tienen un comportamiento semejante.

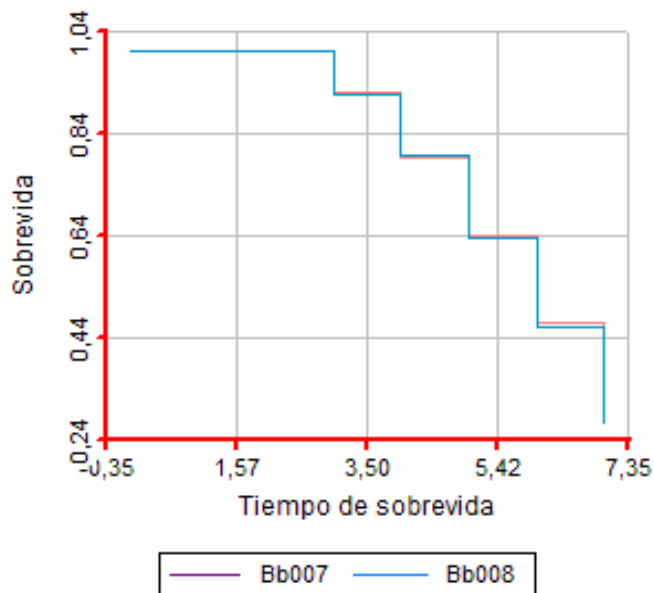


Gráfico 3. Curva de Sobrevida (Kaplan-Meier) de Bb007 y Bb008 a los 7 días del tratamiento.

6.4.3. Bioensayos sobre N II-III y N IV in vitro, sobre hojas desprendidas de tomate.

Como se puede observar en la tabla 8, los resultados indican que ambas cepas de *B. bassiana* resultan patogénicas sobre las N II-III de *T. vaporariorum*, revelando diferencias significativas entre los tratamientos (el testigo y las cepas evaluadas) y el test de Tukey detectó diferencias entre el testigo y las cepas evaluadas, no así entre estas últimas. Tanto la cepa Bb007 como la Bb008 registraron un porcentaje de mortandad medio de 99%, con un coeficiente de variación del 12,34%.

Tabla 8. Análisis de la varianza y cuadro de comparación de medias para N II-III

Variable	N	R ²	CV
Mortandad	450	0,97	12,34

Test: Tukey = 0,05			
Tratamiento	Medias	N	DS
1: Testigo	0,00	150	A
2: Bb008	0,99	150	B
3: Bb007	0,99	150	B

En las figuras 18, 19 y 20 se observan N II-III con síntomas de la micosis.



Figura 18. N II sobre hoja de tomate, infectada por *B. bassiana*. 3X



Figura 19. N II sobre hoja de tomate, infectada por *B. bassiana*. 3X



Figura 20. N III sobre hoja de tomate, infectadas por *B. bassiana*. 3X

En la tabla 9 de N IV se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el test de Tukey reveló diferencias significativas entre el testigo y las cepas evaluadas, no así entre estas últimas. Ambas cepas Bb007 y Bb008 registraron un porcentaje de mortandad medio del 99%, con un coeficiente de variación de 14,33%.

Tabla 9: Análisis de la varianza y cuadro de comparación de medias para N IV

Variable	N	R ²	CV
Mortandad	225	0,96	14,33

Test: Tukey = 0,05			
Tratamiento	Medias	N	DS
1: testigo	0,00	75	A
2: Bb008	0,99	75	B
3: Bb007	0,99	75	B

En las figuras 22, 23 y 24 se observan N IV con síntomas y signos de la micosis.



Figura 22. NIV sobre hoja de tomate, manifestando el síntoma de la infección por *B. bassiana*. 3X.



Figura 24. N IV sobre hoja de tomate, con síntomas y signos de la micosis. 3X



Figura 23. N IV sobre hoja de tomate, con síntomas y signos de la micosis. 3X

En el tratamiento testigo no se observó mortandad asociada a *B. Bassiana*, por lo que no fue necesario hacer correcciones por contaminación.

6.5. Discusión

Los síntomas observados tanto en N II-III como en N IV, asociados a un cambio de coloración manifestado por distintas intensidades de rosado, es coincidente con observaciones realizadas por Shannon (1996), quien también halló las mismas características, en condiciones de laboratorio, al igual que Wraight y otros (1998) para las N IV.

Los porcentajes de control son comparables con los observados por Santamaría y otros (1998) que registraron un porcentaje de 73% de mortandad para las N II, y un porcentaje del 91% de mortandad para las N III, Ramos y otros (2000) obtuvo para las ninfas II y III, porcentajes de mortandad superiores al 70%.

Se pudo comprobar la patogenicidad de ambas cepas, en los estados de N II-III y N IV de *T. vaporariorum*, a la concentración de 10^8 conidios/ml, en condiciones controladas de laboratorio.

6.6. Conclusión

Se concluye que ambas cepas nativas resultan patogénicas para la población expuesta de N II-III y N IV de *T. vaporariorum*, en condiciones in vitro.

El porcentaje de mortandad para las N II-III y NIV del 99%, deja en evidencia la virulencia de las mismas, a la que se suma un $TL_{50\%}$ de 3,4 días y un TMS de 3,7 días.

Capítulo 7: Bioensayos in vivo sobre ninfas N II-III y N IV

Objetivo general:

- Realizar ensayos con las cepas Bb007 y Bb008, para evaluar los niveles de mortandad sobre N II-III y N IV de *T. vaporariorum* en las plantas de tomate, bajo condiciones controladas de invernadero.

Objetivos específicos:

- Evaluar la mortandad en las N II-III de *T. vaporariorum*, con las cepas Bb007 y Bb008.
- Evaluar la mortandad en las N IV de *T. vaporariorum*, con las cepas Bb007 y Bb008.

7.1. Introducción

Confirmada la capacidad patogénica de ambas cepas, bajo condiciones controladas de laboratorio, resulta indispensable la realización de ensayos in vivo en invernadero, donde interfieren en la relación entomopatógeno e insecto factores como: luminosidad, temperatura, humedad, estado fisiológico de los órganos vegetales, etc. Estos ensayos permitirán estimar la capacidad patogénica de las cepas bajo condiciones más cercanas a las de campo.

7.2. Materiales y metodología

Para la realización de los ensayos de control de *T. vaporariorum*, se acondicionaron plantas de tomate en jaulas de cría, las que fueron infestadas con poblaciones homogéneas del insecto.

Para los ensayos in vivo, debido a mayores requerimientos de inóculo, se utilizó para la multiplicación de ambas cepas, arroz como sustrato (figura 25). Para lo cual se realizó una precocción de arroz de 5 minutos, luego se dejó orear, para evitar el apelmazamiento de los granos y se colocó 100 gramos en envases de vidrio. Se esterilizó durante 10 minutos a 120°C en autoclave. En el interior de la cámara de flujo laminar, se realizó la siembra, transfiriendo un pequeño cubo de medio colonizado a los envases. Los envases fueron incubados a 24 ± 1°C durante 10 a 15 días. Transcurrido este tiempo, se procedió a preparar las suspensiones de 10⁸ conidios/ml de cada cepa, para la realización de los ensayos sobre N II-III y N IV.



Fig.25. Dos vistas de producción masiva de *B. bassiana* sobre granos de arroz como sustrato.

Bio-ensayos sobre N II-III y N IV en invernadero

Esta etapa se desarrolló en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias. Se utilizaron tres jaulas de cría, estableciendo una jaula por tratamiento.

Las plantas infestadas con N II-III de *T. vaporariorum*, fueron pulverizadas hasta goteo, con una suspensión de 1×10^8 conidios/ml de cada cepa, utilizándose solo agua destilada para el testigo. En esta fase se usó un pulverizador de previa presión de 1.5 litros, modelo H-1,5.

Las plantas permanecieron en el interior de las jaulas, en el invernadero a una temperatura media máxima de 23, 5°C y media mínima de 8,13°C y un fotoperiodo natural.

La evaluación se realizó a los 7 días en función a la mortandad confirmada de ninfas en cada tratamiento (manifestación del signo de la enfermedad). Se siguió un diseño completamente aleatorizado de cinco repeticiones/plantas por tratamientos. Los datos se analizaron con el programa INFOSTAT (Tukey $\alpha=0,05$). Igual procedimiento fue el seguido para el ensayo in vivo de N IV realizándole la evaluación a los 10 días.

7.3. Resultados

Como se puede observar en la tabla 10 para N II-III de *T. vaporariorum* se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos, el test de Tukey reveló diferencias entre el testigo y las cepas evaluadas, no así entre estas últimas, registrándose para Bb007 un porcentaje de mortandad medio de 45% y Bb008 del 55 % de mortandad, con un CV de 121,46%.

Tabla 10. Análisis de la varianza y cuadro de comparación de medias para N II-III

Variable	N	R ²	CV
Mortandad	450	0,26	121,46

Test: Tukey Alfa= 0,05			
Tratamiento	Medias	N	
1: testigo	0,00	150	A
2: Bb007	0,45	150	B
3: Bb008	0,55	150	B

En la figura 26 se observan tres vistas de N II-III, manifestando el síntoma de la micosis por *B. bassiana*.



Figura 26a. ninfas NII-III sobre hoja de tomate, de color rosadas, debido a la producción de oosporina de *B. bassiana*. 1X



Figura 26b. Dos ninfas NII-III sobre hoja de tomate, manifestando el síntoma de la infección por *B. bassiana*. 1X



Figura 26c. NII-III sobre hoja de tomate, de color rosada, debido a la producción de oosporina de *B. bassiana*. 3X

En la tabla 11 de N IV de *T. vaporariorum*, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, y el test de Tukey reveló diferencias significativas entre los tratamientos (el testigo y las cepas evaluadas) no así entre estos últimos, registrándose para Bb007 una media de mortandad del 98% y Bb008 del 95%, con un coeficiente de variación de 22.76%.

Tabla 11: Análisis de la varianza y cuadro de comparación de medias para N IV

Variable	N	R ²	CV
Mortandad	450	0,91	22,76

Test: Tukey Alfa= 0,05			
Tratamiento	Medias	N	
1: testigo	0,00	150	A
2: Bb008	0,95	150	B
3: Bb007	0,98	150	B

En las figuras 27, 28 y 29 se observan N II-III y N IV manifestando el signo y síntoma de la micosis.



Figura 27. N II, III y IV infectadas por *B. bassiana*. sobre hoja de tomate. 3X



Figura 28. Dos ninfas N IV, sobre hoja de tomate, a la izquierda manifestando síntomas avanzados y a la derecha con síntomas iniciales. 3X



Figura 29. Tres ninfas N IV sobre hoja de tomate, con síntomas y signos de la enfermedad. 3X.

7.4. Discusión

Las ninfas enfermas presentaban una coloración blanquecina algodonosa, con micelio, o varias intensidades de rojo, similar a lo observado en los ensayos in vitro y coincidente con lo descrito por Shannon (1996), también encontraron las mismas características para las ninfas IV, Orozco-Santos y otros (2000) y Quesada-Moraga (2006) con porcentajes de mortandad superiores al 70% en ensayos sobre ninfas de moscas blancas. En condiciones in-vivo Santamaría y otros (1998) registraron un 91,5% de mortandad para las N IV.

Ambas cepas resultaron patogénicas para las N II-III y N IV de *T. vaporariorum*, a la concentración de 10^8 conidios/ml, en condiciones controladas de invernadero.

Resulta importante destacar la respuesta menos variable de las N IV (CV 22, 76%) en comparación con la N II-III (CV 121, 46%).

7.5. Conclusión

Las cepas locales de *B. bassiana* Bb007 y Bb008 ejercen un efecto patogénico aceptable sobre las N II-III y muy promisorio para el control del estadio N IV de *T. vaporariorum*, dado que el promedio de mortandad para ambas cepas supera el 70% en condiciones controladas de invernadero.

Representando una alternativa potencialmente válida para la regulación de poblaciones de mosca blanca, bajo sistemas de producción agroecológico.

CONCLUSIONES FINALES

Fue posible encontrar a *B. bassiana* naturalmente asociado a *T. vaporariorum*, bajo sistemas de producción agroecológica.

Las cepas de *B. bassiana* evaluadas tienen un comportamiento semejante, en cuanto a los parámetros evaluados (crecimiento radial de colonia, producción de conidios y tiempo medio de germinación), por lo que serían potencialmente eficientes para una multiplicación masiva futura.

Se observó que ambas cepas nativas ejercen un efecto patogénico sobre los estados juveniles (N II-III y N IV) de *T. vaporariorum*. En condiciones in vitro se obtuvieron porcentajes medio de mortandad del 99% para N II-III y N IV, con ambas cepas.

En los ensayos in vivo en invernadero los porcentajes de control fueron significativamente más bajos sobre N II-III, que los obtenidos en laboratorio: variando entre el 45% y 55% de mortandad a los 7 días del tratamiento.

Mientras que para las N IV los resultados fueron cercanos a los obtenidos en condiciones de laboratorio, obteniéndose medias superiores al 95% de mortandad a los 10 días del tratamiento.

En función a los resultados obtenidos, las cepas de *B. bassiana* evaluadas resultan una estrategia de regulación de la población de moscas blancas sobre plantas de tomate en invernadero, siendo esto un avance en el posible control del insecto a campo, lo cual involucraría futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- _Abdo, G.; Álvarez, S.; Bonillo, M.; Rolle, R. y Tapia, S. 2008. Producción Hortícola Sustentable. (1^a ed). Ed. INTA. Argentina. 103 pp.
- _Agostini, E.; Sato, R. y Tapia, S. 2005. Cartilla del: "Curso para monitores de moscas blancas". Facultad de Ciencias Agrarias. UNJu. 32 pp.
- _Alcalá de Marcano, D.; Marcano, J. y Morales, M. 1999. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* sobre adultos del picudo de la batata *Cylas formicarius elegantulus* Summers (Curculionidae). Rev. Fac. Agron. (LUZ). Maracaibo-Venezuela. 16: 52-63.
- _Altieri, M. 1999 (a). Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable. Ed. Nordan-Comunidad.: 247-255.
- _Altieri, M. 1999 (b). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment. ELSEVIER.74: 19-31.
- _Altieri, M. y Nicholls, C. 2000. Control Biológico en Agroecosistemas mediante el manejo de insectos entomófagos. Cap. 7. en Agroecología: Teoría y práctica para una Agricultura Sustentable. 1^o ed. México. :147-165.
- _Alves, S. 1998. Fungos entomopatogenicos. In Alves, S. B. Ed. Controle Microbiano de Insectos. 2ed. Sao Paulo, BR, FEALQ.: 333-340.
- _Badii, M. y Abreu, J. 2006. Control Biológico una forma sustentable de control de plagas. Daena: Internacional Journal of Good Conscience. 1(1): 82-89.
- _Bonillo, M. 2008. Agrotóxicos y producción agrícola. El ojo de la tormenta. 46: 15-16
- _Cardona, C.; Rodríguez, I.; Bueno, J. y Tapia, X. 2005. Biología y Manejo de la Mosca Blanca *Trialeurodes vaporariorum* en Habichuela y Fríjol. CIAT. 345: 50.
- _Colmar Serra, A. 1996. Biología de moscas blancas. Muestreos de moscas blancas. En Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus. Ed. Luko Hilje. Catie. N°37. Turrialba. Costa Rica. :11-29.
- _Consuegra N. y Pozo P. 1996. Desarrollo rural humano y agroecológico. CET. CLADES. Chile. :50-62.
- _Crespo, M. 2002. El control biológico y los transgénicos desde la perspectiva agroecológica. LEISA. 17 (4): 18-19.

- _García González, M.; Jiménez Valencia, A. y Pardes Bustillo, A. 2001. Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Costa Rica. 60: 31-35.
- _Herrera García, A. 2007. Plaguicidas. Ciencia y Trabajo. 9 (26): 147-151.
- _Hill, B. 1969. A morphological comparison between two species of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (WESTW.) and *Bemisia tabaci* (GENN.) (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE) which occur on tobacco in the transvaal. PHYTOPHYLACTICA. 1: 127-146.
- _Humbert, R. 1998. Entomopathogenic Fungal Identification. APS/ESA Joint Annual Meeting. Ithaca. 28pp.
- _Kirk, P., Cannon, P., David, J. y Stalpers, J. 2001. Dictionary of Fungi. (9ª ed). CAB. International, Wallingford, Oxon, RU. 655pp.
- _Lecuona, R. 1992. Control Microbiano de Plagas en general con especial referencia a los hongos entomopatógenos. Boletín de divulgación técnica. INTA. Arg. 95: 3-4.
- _Lecuona, R. (Ed.). 1996. Microorganismos Patógenos empleados en Control Microbiano de Insectos Plagas. Bs. As. Argentina.: 35-42; 143-150.
- _Lecuona, R. y Díaz, B. 2001. Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) a los hongos entomopatógenos *Nomuraea rileyi*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. INTA. Argentina. RIA. 30 (1): 25-42.
- _Lomer, C. y Lomer, C. (Ed.). 2001. Pathologie d' insectes, Manual. Programa Lubilosa. Francia. Pag.19. Disponible on line www.lubilosa.org/Engl05a.PDF
- _López Ávila, A. 2008. Biología y control biológico de las moscas blancas. MIP. Corpoica. Consulta realizada 07/11/08 en: <http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Foros/ByCBdeMoscasblancas3.pdf>
- _López, L. y Hans Börje L. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de biodiversidad. 6:12-15.
- _McLaughlin, A y Pierre, M. 1995. The impact of agricultural practices on biodiversity. Agriculture, Ecosystems and Environment. ELSEVIER. 55: 201-212.
- _Orozco-Santos, M.; Farias-Larios, J.; López-Pérez, J. y Ramírez-Vázquez, N. 2000. Uso de *Beauveria bassiana* para el control de *Bemisia argentifolli* en melón. CATIE. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. Costa Rica. 56: 46-51.

- _Pariona, N.; Castellanos, P. y León, E. 2007. Capacidad entomocida de cepas nativas de *Beauveria* sp. sobre *Schistocerca piceifrons peruviana* (Lynch Arribalzaga, 1903). Rev. Perú biol. 14 (2): 253-258.
- _Pérez Consuegra N. 2003. Agricultura Orgánica: bases para el manejo ecológico de plagas. CEDAR-ACTAF. Cuba. 50-62.
- _Pimentel, D.; Acquy, H.; Biltonen, M.; Rice, P.; Silva, M.; Nelson, J.; Lipner, V.; Giordano, S.; Horowitz, A. y D'Amore, M. 1995. Impacto económico ambiental del uso de pesticidas. Agroecología y Desarrollo. CLADES. Chile. 8-9: 60-66.
- _Pucheta Díaz, M.; Flores Macías, A.; Rodríguez Navarro, S. y De La Torre, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia. 31 (12): 856-860.
- _Quesada-Moraga, E.; Maranhao, E.; Valverde-García, P. y Santiago- Alvarez, C. 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. Biol. Control. Springer Netherlands. 36: 274-287.
- _Ramos, E.; Alves, S.; Tanzini, M. y López, R. 2000. Susceptibilidad de *Bemisia tabaci* a *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio. CATIE. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. Costa Rica. 56: 62-69.
- _Rodríguez Dos Santos, A., Del Pozo Núñez, E. 2003. Aislamiento de Hongos Entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. Agrociencia. 7 (2): 71-78.
- _Samson, R.; Evans, H. y Latge, J. 1988. Atlas of Entomopathogenics fungi. Netherlands, Springer- Verlag. Berlin.: 14-16.
- _Santamaría A.; Costa-Comeles, J.; Alonso, A.; Rodrigues, J. y Ferrer, J. 1998. Ensayo del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vullemin para el control de la mosca blanca de los cítricos *Aleyrothrixus floccosus* (Maskell) (Homoptera: *Aleyrodidae*) y su acción sobre el parásito *Cales noacki* (Howard) (Hymenoptera: *Aphelinidae*). Bol. San. Veg. Plagas. 24: 695-706.
- _Sarandón. S. 2002. Problemas asociados a la agricultura moderna. Ed. Científicas Americanas. La Plata- Bs. As. Argentina. 558pp.
- _Silva, A., Lagunas, A., Concepción, J., Rodríguez, M. y Rodríguez, L. 2002. Insecticidas Vegetales: una nueva alternativa para el manejo de plagas.

- CATIE. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. Costa Rica. 66: 4-12.
- _Shannon, P. 1996. Hongos Entomopatógenos. En Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus. Ed. Luko Hilje. Catie. N°37. Turrialba. Costa Rica. :60-68.
- _Tilman, D.; Duvick, D.; Brush, S.; Cook, J.; Daily, G.; Heal, G.; Naeem, S. y Notter, D. 1999. Beneficios de la Biodiversidad. Task Force Report. N°133. Council for Agricultural Science and Technology. EEUU. 33pp.
- _Van Driesche, R. y Bellows, T. 1996. Biological Control. Ed Chapman y Hall. New York. 539 pp.
- _Vargas Flores, M. 2003. Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (SACCARDO) PETCH y su virulencia en *Phthorimaea operculella* (ZELLER) y *Symmetrischema tangolias* (GYEN). Tesis. Universidad Mayor de San Marcos. Lima- Perú. Consulta realizada 20/11/09 en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/vargas_fm/T_completo.PDF
- _Vigiani, A. 2005. Hacia el control integrado de plagas. 3ª ed. Ed. UNJu. Argentina. 127pp.
- _Viscarret, M. 2000. Estudios biológicos sobre Aleyrodidae (Insecta: Hemiptera) con énfasis en el complejo *Bemisia tabaci* (Gennadius) y su posible control biológico. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. 131pp.
- _Wraight, S.; Carruthers, R.; Bradley, C.; Jaronski, S.; Lacey, L.; Wood, P. y Galani-Wraight, S. 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces spp.* and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Journal of Invertebrate Pathology. 71:217-226.