

Evaluación de la patogenicidad de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del oeste argentino, sobre insectos no objetivo: *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) y *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)



Tesista: María Josefina Segura Zuin

Director: Rodrigo López Plantey

Co Director: Gabriela Susana Lucero

2019

Evaluación de la patogenicidad de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del oeste argentino, sobre insectos no objetivo: *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) y *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Tesista: María Josefina Segura Zuin

mjosefinasz@gmail.com

Director: Rodrigo Javier López Plantey

r.lopezplantey@gmail.com

Co Directora: Gabriela Susana Lucero

slucero@fca.uncu.edu.ar

Comité Evaluador:

Roig Juñent, Sergio

Albrecht, Eduardo

Quiroga, Viviana

Laboratorio de Fitopatología, Cátedra de Fitopatología, Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Agrarias, Almirante Brown 500, Chacras de Coria, Mendoza - (54 261) 4135000, Argentina. CP: 5507

“Atravesamos desiertos, glaciares, continentes,
el mundo entero de extremo a extremo,
empecinados, supervivientes,
el ojo en el viento y en las corrientes,
la mano firme en el remo.
Cargamos con nuestras guerras
nuestras canciones de cuna,
nuestro rumbo hecho de versos,
de migraciones, de hambrunas.
Y así ha sido siempre, desde el infinito.
Fuimos la gota de agua viajando en el meteorito,
cruzamos galaxias, vacío, milenios,
buscábamos oxígeno; encontramos sueños,
encontramos sueños”.

Jorge Drexler

RESUMEN

La lucha contra plagas se realiza principalmente con productos químicos. Con ello, se abre la discusión respecto a la sostenibilidad de dicho método, por los diversos inconvenientes que presenta. Una alternativa de control y manejo de plagas, enfermedades y malezas es en forma biológica, que consiste en utilizar organismos vivos, como el uso de hongos entomopatógenos. No obstante, se debe tener en cuenta el posible impacto negativo de estos organismos en insectos benéficos del agroecosistema. El objetivo del presente trabajo fue evaluar, en condiciones controladas, la patogenicidad de distintas cepas de tres especies de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del oeste argentino: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* y *Paecilomyces lilacinus* sobre el enemigo natural *Harmonia axyridis* y el polinizador *Apis mellifera*. Se incluyeron en el ensayo tres cepas comerciales de la especie *B. bassiana*, dos de ellas de procedencia italiana. Los bioensayos en laboratorio se realizaron bajo condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60%) y fotoperíodo (16:8), y se experimentaron tratamientos con suspensiones de 10^7 mL⁻¹ UFC de cada una de las cepas. Las técnicas de inoculación fueron por aspersión directa y por contacto para ambas especies de insecto, se incluyó también el tratamiento por transferencia en *A. mellifera*, al ser un insecto social. Los resultados obtenidos en adultos de *H. axyridis* mostraron que ninguna de las cepas evaluadas en todos los bioensayos manifestó efecto patogénico, posiblemente por el robusto sistema inmunitario que la especie ha desarrollado. En el caso de *A. mellifera* se observó que en los métodos de infección por aspersión y contacto sólo ciertas cepas tuvieron acción patogénica sobre los adultos del polinizador, por transferencia no hubo transferencia del hongo. Los resultados obtenidos refuerzan la alternativa de utilizar las cepas evaluadas para el control de plagas, siendo necesario estudios más detallados de la patogenicidad en condiciones de campo.

PALABRAS CLAVE: hongos entomopatógenos, enemigos naturales, polinizadores, control biológico.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las personas que me ayudaron en el camino de esta Tesina, y a todos los que me acompañaron en los años de mi Carrera:

A Dios, porque siempre has estado conmigo, porque soy inmensamente feliz, y porque me das infinitas oportunidades.

A la Universidad pública y gratuita que me permitió formarme, y a la Facultad de Ciencias Agrarias en la que tuve de docentes a excelentes personas.

A Rodrigo, por tu paciencia, tu acompañamiento, tus ganas incansables de llegar más allá de lo que creemos que podemos; por mostrarme el mundo de la Investigación con pasión y profesionalismo. Te admiro. Y gracias a Gaby, por estar dispuesta a darme una mano cada vez que lo necesité.

A mamá y papá, por apoyar mis decisiones con Amor, por ser el respaldo que no me deja caer... porque los hijos somos el reflejo de los padres, y todo lo que soy se lo debo a ustedes. Gracias por ser ejemplo de trabajo diario, y hacerme ver que el conocimiento está esperando a que vayamos por él sin importar la edad ni el tiempo.

A Nico y Vale, porque son de las mejores personas que habitan el Planeta, por estar atentos a mis necesidades, por compartir mis pasiones e impulsarme hacia adelante. Agradezco esta fraternidad que nos une, porque son mi Vida.

A Ali por estar siempre presente, siguiendo mis pasos, deseándome éxitos con llamadas telefónicas interminables el día previo a cada final; gracias Negra porque nunca existió distancia que nos separe. Y gracias Hetitor porque también sos mi familia y me has alentado a llegar hasta acá.

A la Cátedra de Fitopatología por recibirme amablemente, en especial gracias a Caro y Cuca por las charlas y risas compartidas. Gracias Andrés y Antonella por dedicar vuestro tiempo a colaborar en los bioensayos; a Miriam por estar atenta a la búsqueda de vaquitas y por tus consejos; a Juricich por brindarnos las abejas para los bioensayos; y muchas gracias a Euge, Rubén y Marcelo por el tiempo que me regalaron para afinar los análisis estadísticos. Gracias Agustinita por la hermosa presentación que me ayudaste a preparar.

A mi amiga y hermana Jime, por ser la mejor, por compartir tantas pasiones y la Vida. A Leti, Jupi y Fer con quienes transité los primeros años de la carrera forjando un lazo que nos uniría para toda la Vida. Gracias a Pau, por todos los momentos de estudio compartidos, porque nos empujamos mutuamente sin dejarnos bajar los brazos, gracias por los consejos que me diste y que siempre tomé, y por enseñarme a ser mejor persona. Gracias a Flor, Nicky, Franco, Fran y Tobi, porque afrontamos los últimos años juntos y con ustedes disfruté, crecí y aprendí. A mis amigas de la vida (gente linda) y del club, por entenderme, y aceptar mis decisiones y prioridades. Gracias Guadi porque apareciste al final del recorrido pero con vos reafirmo mi pasión por esta carrera; y gracias Nati, por tu ayuda para descubrirme en mi primer experiencia profesional, por enseñarme a confiar en mí y por transmitirme el amor hacia el mundo forestal.

Por último, gracias Titi por hacer la mitad de la Carrera conmigo, porque estudiamos juntos los domingos en la mañana cuando íbamos con apuntes a pasear, porque me ayudaste a recolectar las vaquitas en el bosque, por escucharme hablar de teorías, procesos y fundamentos con máxima atención. Gracias por ser mi bastón, por compartir mis pasiones, por empujarme a ir en busca de mis sueños. El Amor que te tengo es infinito.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis.....	2
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo general.....	2
1.2.2 Objetivos específicos.....	2
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Control biológico	4
2.2 Enemigos naturales.....	4
2.2.1 Atributos bioecológicos de los EN.....	5
2.2.2 Depredadores.....	6
2.2.3 Patógenos.....	9
2.3 La polinización y <i>Apis mellifera</i>	17
2.4 Interacciones entre los HE e insectos no-objetivo.....	20
2.5 Control biológico y polinización como servicios ecosistémicos.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Determinación de la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos sobre <i>Harmonia axyridis</i> mediante la técnica de aspersion	22
3.2 Determinación de la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos sobre <i>Harmonia axyridis</i> mediante técnica de contacto	24
3.3 Determinación de la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos sobre <i>Apis mellifera</i> mediante la técnica de aspersion.....	24
3.4 Determinación de la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos sobre <i>Apis mellifera</i> mediante la técnica de contacto.....	28
3.5 Determinación de la patogenicidad de las cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre <i>Apis mellifera</i> mediante la técnica de transferencia.....	28
3.6 Comparación de la mortandad ocasionada por los medios de inoculación en las cepas que presentaron patogenicidad.....	29
4. RESULTADOS de la determinación de patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del Oeste argentino sobre individuos adultos.....	30
4.1 De <i>Harmonia axyridis</i> mediante la técnica de aspersion y contacto	30
4.2 De <i>Apis mellifera</i> mediante la técnica de aspersion	30
4.3 De <i>Apis mellifera</i> mediante la técnica de contacto.....	31
4.4 De <i>Apis mellifera</i> mediante la técnica de transferencia	32

4.5 Comparación de la mortandad ocasionada por los medios de inoculación en las cepas que presentaron patogenicidad.....	32
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	34
6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Huevos de coccinélidos dispuestos en clústers.....	7
Figura 2: Pupa de coccinélidos adheridos por el abdomen a la superficie de hojas de duraznero	7
Figura 3: Adulto de <i>H. axyridis</i>	9
Figura 4: A. Esquema de conidióforos agrupados (B, C y D), conidióforos solitarios (E) y conidios (F) de <i>B.bassiana</i> (Barnett y Hunter, 1998). B. Microfotografía de conidióforos y conidios de <i>B.bassiana</i> (Tomada por Kouassi, 2001). C. Morfología de la colonia de <i>Beauveria</i>	12
Figura 5: A. Esquema de conidióforos (B y C), y conidios (D) de <i>Metarhizium</i> (Barnett y Hunter, 1998). B. Microfotografía de conidios en cadena de <i>Metarhizium</i> . C. Morfología de la colonia de <i>Metarhizium</i> (Fotografía de: García et al 2014).	13
Figura 6: Montaje y observación microscópica del género <i>Isaria</i> (antes <i>Paecilomyces</i>). (a) Sinema. (b-e) Conidióforos (fiálides) con base ensanchada y cuello extendido. Fuente: Humber (2012), p. 177. .	14
Figura 7: Estructura de la cutícula del insecto y mecanismo de penetración del HE (Schapovaloff, 2012, modificado de Duperchy, 2003).	15
Figura 8: Autopolinización y polinización cruzada (Apolo).	18
Figura 9: Fotografías de <i>A. mellifera</i> realizando la polinización.	19
Figura 10: Cabeza de <i>A. mellifera</i> y las principales estructuras relacionadas a la visión, el olfato y la alimentación. Fuente: Quero (2004).....	19
Figura 11: A. Abdomen de la abeja obrera. B. El aguijón de la abeja obrera. Fuente: Quero (2004)....	20
Figura 12: Adultos de <i>H. axyridis</i> acondicionados en recipientes plásticos para la realización de bioensayos.....	22
Figura 13: Método de inoculación por contacto en adultos de <i>H. axyridis</i>	24
Figura 14: Adultos de <i>A. mellifera</i> recolectados en el apiario de la FCA.	25
Figura 15: Métodos de inoculación utilizados en el bioensayo de <i>A. mellifera</i> : 1. Infección por aspersión directa; 2. Infección por contacto; 3. Infección por transferencia (F) alimento; (W) agua. Fuente: Poidatz <i>et al.</i> (2018).	27
Figura 16: Individuos muertos de <i>A. mellifera</i> en cámara húmeda.	27
Figura 17: Método de infección por contacto en <i>A. mellifera</i>	28
Figura 18: Recipientes del método por contacto y por transferencia en condiciones controladas.	29
Figura 19: Ejemplo de la evolución post mortem de la afección del hongo <i>M. robertsii</i> cepa MsoilAR-2.5 (2) sobre un individuo adulto de <i>A. mellifera</i> . (A) 72 h, (B) 120 h, y (C) 168 h. Fotos: López Plantey R.....	31
Figura 20: Adultos de <i>A. mellifera</i> infectados por el hongo <i>Paecilomyces lilacinus</i> (A) cepa PsoilAR-24.3 (B) cepa PsoilAR-4.1(2). Fotografías propias.....	32

Figura 21: Valores de media de IM de las cepas que mostraron acción patogénica; es decir, porcentaje de abejas muertas por infección por HE, según los métodos de inoculación (Prueba Wilcoxon $\alpha=0,05$).32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de las Divisiones más importantes de HE (Ríos, 2017).....	10
Tabla 2: Listado y nomenclatura de las cepas de hongos entomopatógenos evaluados sobre adultos de <i>H. axydiris</i>	23
Tabla 3: Listado y nomenclatura de las cepas de hongos entomopatógenos evaluados sobre adultos de <i>Apis mellifera</i>	25
Tabla 4: Valores de media del IM y D.E. obtenidos por cepa mediante el método de inoculación por Aspersión.....	30
Tabla 5: Valores de media del IM y D.E. obtenidos por cepa mediante el método por Contacto.	31
Tabla 6: Resultados de la Prueba Wilcoxon para los métodos de inoculación por Aspersión y por Contacto.	33

ABREVIATURAS

CB: Control biológico

EN: Enemigos naturales

HE: Hongos entomopatógenos

HR: Humedad relativa

MIP: Manejo Integrado de Plagas

PAM: Péptidos antimicrobianos

RS: Radiación solar

SE: Servicios Ecosistémicos

T: Temperatura

UV: Luz ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

Los viñedos y la mayoría de los cultivos, tanto a nivel nacional como internacional, están sufriendo modificaciones a causa del impacto negativo que genera el cambio climático. En los cultivos de vid, estos cambios se relacionan con el aumento de la incidencia de ciertas enfermedades, la inducción de plagas existentes, como también la introducción de nuevas plagas en territorio nacional. Ejemplo de esto último, es el caso de *Lobesia botrana* “polilla de la vid”, que ha obligado a los productores vitícolas afectados a realizar tratamientos fitosanitarios en el viñedo, principalmente con moléculas de síntesis no usadas hasta el momento.

La realización de control químico plantea una discusión respecto a la sostenibilidad del método por los diversos inconvenientes que presenta su implementación. Por un lado, existe una preocupación pública sobre los efectos de los productos de síntesis en la salud humana y en la biodiversidad del agroecosistema. Por el otro, el impacto negativo sobre los enemigos naturales (EN), por la escasa o nula selectividad que poseen y por la inducción del desarrollo de resistencias de otras plagas y microorganismos fitopatógenos (Gutiérrez *et al.*, 2013).

La tendencia actual de exigir alimentos inocuos al ser humano y compatibles con el desarrollo de una agricultura sustentable, conlleva a la disminución del uso de plaguicidas químicos y a la búsqueda de alternativas como ser el control biológico (CB). Los organismos utilizados como CB son los EN y los microorganismos: virus, bacterias, protozoarios y hongos, siendo estos últimos muy estudiados. Los hongos entomopatógenos (HE) presentan un mecanismo de patogenicidad del cual se conocen todas las etapas (adhesión, germinación, penetración, invasión y proliferación) (Mena, 2010), lo que permite establecer distintas estrategias de aplicación para eficientizar su uso como CB (Franco *et al.*, 2011).

Los Géneros de HE de mayor importancia para el CB son: *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* (Motta y Murcia, 2011). Esto es debido a que se encuentran con alta frecuencia en la naturaleza, son efectivos al controlar una amplia diversidad de especies pertenecientes a órdenes de insectos como Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera y Hemiptera, y han sido formulados para el desarrollo de productos comerciales destinados al manejo de plagas de insectos (France *et al.*, 2016).

Por otro lado, los EN son organismos que afectan a otros seres vivos, pudiendo actuar sobre el normal desarrollo de las poblaciones (Garrido *et al.*, 2007). En condiciones adecuadas, pueden regular a ciertas plagas manteniendo las densidades poblacionales dentro de los rangos económicamente tolerables (Vargas y Ubillo, 2001). Existen numerosos EN que pertenecen a la clase Insecta, como ser los individuos de la familia Coccinellidae dentro del orden Coleoptera. Esta familia se caracteriza por agrupar especies depredadoras que se alimentan de desoves y de los primeros estadios larvales de lepidópteros de importancia agrícola, de trips, y por ser preferentemente afidófagas (se alimentan de pulgones), a excepción de la subfamilia Epilachninae que incluye a especies fitófagas (Van Driesche *et al.*, 2007; Nicholls, 2008). *Harmonia axyridis* es un coccinélido nativo de Asia, considerado eficaz depredador de áfidos y otros insectos de cuerpo blando; y a su vez es un invasor exitoso debido a su excepcional adaptación incrementando sus poblaciones y extendiendo su distribución rápidamente.

Otro grupo de insectos de gran importancia económica y ecológica en los agroecosistemas son las abejas, debido a que gran parte de los alimentos que se consumen y se comercializan masivamente, dependen directa o indirectamente de la polinización que realizan. La polinización es la transferencia de polen desde los estambres hasta el estigma, y hace posible la fecundación con la consecuente producción de frutos. Aunque puede ser llevada a cabo tanto por vectores bióticos como abióticos, la

gran mayoría de las plantas con flores dependen principalmente de los insectos para la polinización, siendo la abeja común la más importante en sistemas agrícolas. Existen diferentes especies polinizadoras, pero la más reconocida a nivel mundial es *Apis mellifera* L., “abeja europea”, que es utilizada para la producción de miel, cera y resinas, entre otros productos (FAO, 2014).

El uso de HE puede tener efectos negativos sobre la entomofauna al afectar especies de insectos “no objetivo” (aquellos organismos no considerados plaga en el agroecosistema). Para la propuesta de la aplicación de HE en un programa de CB, el producto a desarrollar debe involucrar investigaciones de base, a fin de determinar el nivel de interacción del hongo con su hospedero y con el ambiente (Motta y Murcia, 2011).

1.1 Hipótesis

Los hongos entomopatógenos afectan de forma diferencial a los insectos, por lo que se espera que su patogenicidad sea diferente en distintos organismos del agroecosistema. A su vez, algunos insectos presentan mecanismos de defensa contra estos entomopatógenos como ser su sistema inmune y modificaciones en el comportamiento. Por lo anterior se postula que los hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del oeste argentino *Metarhizium robertsii*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* tendrán distinto efecto patogénico sobre el enemigo natural de plagas agrícolas *Harmonia axyridis* y el polinizador *Apis mellifera*.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar, en condiciones controladas, la patogenicidad de diferentes cepas de tres especies de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del oeste argentino *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* y *Paecilomyces lilacinus* sobre el enemigo natural de plagas agrícolas *Harmonia axyridis*, y el polinizador *Apis mellifera*.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del oeste argentino sobre individuos adultos de *Harmonia axyridis* mediante la técnica de aspersión.

2. Determinar la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del oeste argentino sobre individuos adultos de *Harmonia axyridis* mediante técnica de contacto.

3. Determinar la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del oeste argentino sobre individuos adultos del polinizador *Apis mellifera* mediante la técnica de aspersión.

4. Determinar la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del oeste argentino sobre individuos adultos del polinizador *Apis mellifera* mediante la técnica de contacto.

5. Determinación de la patogenicidad de las cepas de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del oeste argentino sobre individuos adultos del polinizador *Apis mellifera* mediante la técnica de transferencia.

6. Comparar la mortandad ocasionada por los medios de inoculación en las cepas que presentaron patogenicidad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Control biológico

El CB es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos (EN y microorganismos) para reducir la densidad poblacional de individuos considerados plaga (Fishbein, 2012). Las plagas agrícolas afectan a los cultivos y pueden reducir o anular el rendimiento de una producción generando pérdidas económicas.

Existen diversos métodos para el manejo de individuos no deseados en el agroecosistema: el uso de productos de síntesis química (plaguicidas), cultivos genéticamente modificados resistentes a plagas, lucha física por radiaciones, lucha cultural, lucha biotecnológica (con quimioesterilizantes, atrayentes, feromonas, repelentes, entre otros), el CB, o el manejo integrado de plagas (MIP) que es la combinación de una o más de la técnicas antes mencionadas.

En el caso del CB, pueden identificarse diferentes estrategias que se caracterizan por el tipo de EN a emplear, por la forma en que el EN se libera o manipula, y por el resultado inmediato o a largo plazo del manejo de la plaga. Las categorías principales de aplicación de CB son tres: clásico, aumentativo y conservativo. El primero se realiza ante la presencia de una plaga exótica, es decir, cuando una especie considerada plaga se establece en áreas que no se corresponden con su hábitat nativo y que, por lo tanto, no cuenta con la presencia de EN que la controle. En consecuencia, para poder regular su densidad poblacional de manera sostenida en el tiempo se introduce un EN exótico a fin de que se establezca de forma permanente. El CB aumentativo se realiza en áreas donde el número de EN no es suficiente para realizar un control efectivo de la plaga, y tiene como objetivo incrementar la densidad de los EN presentes en el agroecosistema. La estrategia consiste en liberar periódicamente EN que no se encuentran en la zona afectada por medio de dos tipos de liberaciones: inundativas o inoculativas. En la primera se realiza una liberación masiva de los individuos que consecuentemente produce una disminución rápida de la plaga o la extinción de la misma. Por lo tanto, puede esperarse que no se reproduzcan en el tiempo los individuos liberados y sean necesarias liberaciones posteriores en el caso de que la plaga reaparezca. Por su parte, la liberación inoculativa de EN es periódica y de un número menor de individuos por cada evento de liberación, por lo que se espera una regulación de la plaga de una forma más persistente en el tiempo que la inundativa. Para esto, la población de la plaga debe ser de un tamaño suficiente como para soportar una segunda o tercera generación del agente liberado. Por último, el CB conservativo apunta a utilizar medidas para proteger, aumentar la abundancia y mejorar las actividades de los EN presentes en el agroecosistema. Para esto, es importante reducir los factores que limitan a la población de EN o que influyen de manera negativa en su acción reguladora. Otra aplicación de esta estrategia consiste en potenciar los recursos que los EN necesitan para su desarrollo a partir de la manipulación del agroecosistema (provisión de alimento y refugio, diversificación de hábitat, y otros). Generalmente es necesario implementar de manera simultánea más de un método para controlar a la plaga eficazmente, para lo cual podrían combinarse las tres estrategias de CB entre sí o incluso con otras tácticas de control para llevar a cabo un plan de MIP (Nicholls, 2008; Fischbein, 2012).

2.2 Enemigos naturales

La densidad poblacional de los organismos que causan daños en los agroecosistemas depende de factores abióticos, como la humedad y la temperatura, y de factores bióticos, como los EN. Éstos son definidos como organismos vivos que afectan negativamente el desarrollo normal de una población plaga, o causan la muerte de la misma.

Una de las clasificaciones de los EN se realiza en función del tipo de interacción que presentan con los insectos plaga. Los entomófagos depredan o parasitan a la plaga; mientras que el grupo de los entomopatógenos son microorganismos (bacterias, hongos, nematodos, virus, entre otros) que provocan enfermedades ocasionando posteriormente la muerte del huésped (Garrido *et al.* 2007). En condiciones adecuadas, este grupo de organismos puede mantener la densidad de poblaciones de insectos plaga dentro de rangos económicamente tolerables, logrando consecuentemente una disminución de costos, mejora de la calidad del ambiente, disminución de la resistencia a pesticidas, entre otros. Sin embargo, su éxito se fundamenta en la sobrevivencia para relegar el empleo de pesticidas a situaciones tales como el control de niveles poblacionales críticos o la eliminación de plagas con restricción cuarentenaria. Luego, es fundamental conocer el efecto de los pesticidas y biocidas sobre los EN para evitar el uso de aquellos que tienen consecuencias negativas y fomentar la utilización de los que tienen características selectivas (Vargas y Ubillo, 2001).

2.2.1 Atributos bioecológicos de los EN

En general, para que los EN se consideren efectivos y puedan ser usados en programas de CB de plagas agrícolas, tienen que presentar algunas de las siguientes características (Bahena, 2008):

- 1- Alto grado de especificidad a un determinado huésped/presa, lo que indica una buena adaptación del EN al huésped y una dependencia ligeramente directa sobre los cambios de la población del mismo (Nicholls, 2008).
- 2- Alta capacidad de crecimiento poblacional (o capacidad reproductiva) con respecto a su huésped/presa, que sería el caso de aquellas especies que tienen un periodo corto de desarrollo y una fecundidad relativamente alta. De esta manera, pueden producirse varias generaciones del EN para una generación del huésped y asegurar un control rápido.
- 3- Adaptabilidad a los cambios en las condiciones climáticas, de manera que el EN pueda alcanzar amplias distribuciones, ocupando los mismos nichos habitados por su huésped y al mismo tiempo pueda tener una buena supervivencia.
- 4- Capacidad de búsqueda, particularmente a bajas densidades del huésped/ presa, lo que implica en primer lugar que el EN localice el hábitat y luego, que encuentre al huésped o presa.
- 5- Capacidad de mostrar densidad de dependencia, es decir, que modifique su acción en función de su propia densidad de población y la del huésped/presa. Implica un proceso regulador, mediante el cual intensifican o disminuyen su actividad en base a distintos mecanismos:
 - a) Respuesta funcional, que se refiere al cambio en el comportamiento de los EN en función de los cambios en la densidad del huésped o presa
 - b) Respuesta numérica, que se define como la respuesta (reproducción, inmigración, sobrevivencia) del EN que resulta de los cambios en la densidad del huésped o presa
 - c) Un mecanismo de densodependencia, sería un tipo de respuesta funcional, en base a su propia densidad de población.
- 6- Atributos intrínsecos como la sincronización con la fenología del huésped o presa, y la habilidad de supervivencia durante periodos de disminución y/o ausencia del huésped o presa.

Una consideración práctica que puede agregarse a la lista anterior, es la factibilidad de que las especies pudiesen criarse masivamente, en forma práctica y económica. Esto facilitaría la distribución,

comercialización y colonización del material criado, y haría posible un control temprano y oportuno de las plagas (Bahena, 2008).

2.2.2 Depredadores

Los hábitos depredadores se distribuyen en las clases Insecta y Arachnida, y se encuentran en gran número de órdenes y familias (Nicholls, 2008). Dentro del grupo de artrópodos depredadores potenciales de plagas agrícolas se encuentran los órdenes Coleoptera, Odonata, Neuroptera, Hymenoptera, Araneae, Diptera y Hemiptera. Existen más de 30 familias de insectos depredadores, de las cuales Anthicoridae, Nabidae, Reduviidae, Geocoridae, Carabidae, Coccinellidae, Nitidulidae, Staphylinidae, Chrysopidae, Formicidae, Cecidomyiidae y Syrphidae son las más importantes en el manejo de plagas en un agroecosistema (Van Driesche *et al.*, 2007).

Generalmente los depredadores son más grandes que sus presas, y deben alimentarse durante todo su ciclo de vida para llevar a cabo sus funciones esenciales, por lo que buscan el alimento activamente (Bahena, 2008). Pueden clasificarse en tres grupos dependiendo de la especificidad con respecto a las presas de las que se alimenta:

- los polífagos consumen un amplio rango de especies presa;
- los oligófagos se alimentan de un rango más estrecho de las mismas;
- los monófagos son aquellos que consumen una sola especie, destacándose por ser altamente específicos en su alimentación.

Desde el punto de vista del CB, los depredadores oligófagos y monófagos son mejores como agentes de regulación. Contrariamente, los polífagos tienen una actividad depredadora que no se concentra sobre una plaga en particular, sino que tienden a alimentarse de aquellas presas más abundantes o de más fácil captura (Van Driesche *et al.*, 2007; Bahena, 2008; Nicholls, 2008).

2.2.2.1 Características generales de los coccinélidos

El orden Coleoptera incluye a más de 110 familias, muchas de las cuales son depredadoras. Entre las más importantes para el CB se encuentran: Coccinellidae, Carabidae y Staphylinidae, siendo la primera el grupo de mayor importancia en cultivos (Nicholls, 2008).

Los coccinélidos son insectos conocidos comúnmente como “vaquitas”, “vaquitas de San Antonio”, “catarinitas”, “cotorritas”, “mariquitas” o “chinitas” (Nicholls, 2008; González, 2014). Se han registrado 6000 especies a nivel mundial, de las cuales 1562 se describen en América del Sur y 160 especies han sido citadas para la Argentina (González, 2014). A continuación se mencionan los principales aspectos morfológicos y biológicos de estos individuos.

2.2.2.1.1 Morfología

Los coccinélidos adultos pueden tener forma redondeada u oval, convexa y generalmente compacta, con los tres pares de patas parcialmente ocultos. El tamaño promedio es de 2 a 6 mm, aunque existen especies de alrededor de 1 mm y otras que superan los 18 mm. Generalmente los élitros son de colores amarillos, rojos y naranjas, adornados con blanco y negro. Otras especies pueden tenerlos de colores opacos en tonalidades tierra que varían entre el amarillo pajizo y el castaño oscuro o negro. Los diseños en el pronoto y en los élitros son variables, y se centran en grandes áreas o forman pequeñas manchas ovales o irregulares.

Los huevos poseen forma elongada, y son dispuestos en clústers sobre las superficies de las hojas (Figura 1). Pueden medir desde 0,25 mm hasta 2,5 mm de largo, siendo el promedio de 1 mm. La

superficie de los huevos es lisa y brillante, y son de color naranja, amarillo o crema, existiendo pocas especies con colores verdosos o grisáceos. Al madurar van tomando color oscuro y al salir la larva se ponen blancos.



Figura 1: Huevos de coccinélidos dispuestos en clústers (Fotografía propia).

El estadio de larva presenta diferentes formas: alargadas u ovaes, y normalmente algo aplanadas; con tres pares de patas bien desarrolladas. Los colores pueden ser negro con rojo, naranja o amarillo, o colores suaves (crema, rosa o marrón). Algunas especies son cazadoras voraces muy ágiles, y pueden trasladarse hasta doce metros por día en busca de su presa. El último estadio larval permanece relativamente inactivo antes de agarrarse por el abdomen a una hoja u otra superficie para pupar.

La pupa presenta colores claros, naranja o amarillo, con manchas negras (Figura 2) (González, 2014). La pupación dura de tres a doce días, según la especie y la temperatura.

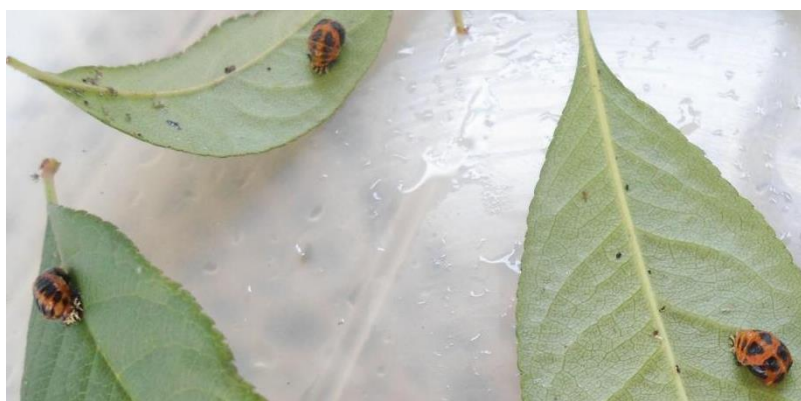


Figura 2: Pupas de coccinélidos adheridos por el abdomen a la superficie de hojas de duraznero (Fotografía propia).

2.2.2.1.2 Biología

La familia Coccinellidae ha sido ampliamente estudiada por las Ciencias Biológicas y Agrícolas debido a la importancia que tiene para la agricultura. Los dos aspectos biológicos más profundizados tienen que ver con el comportamiento alimentario y el desarrollo.

Los coccinélidos presentan distintos regímenes alimentarios, siendo el principal la zoofagia (es decir, son depredadores), aunque hay una subfamilia que es fitófaga (se alimentan de vegetales) y también hay grupos menores que incluyen la micofagia (se alimentan de hongos) y polen.

La zoofagia es realizada por especies en estadio adulto y de larva. Las presas habitualmente consumidas pertenecen al orden Hemiptera, como “pulgones” (familia: Aphidoidea), “cochinillas” (familia: Coccoidea), “moscas blancas” (familia: Aleyrodoidea), “psílidos” (familia: Psyllidae) y “cochinillas algodonosas” (familia: Margarodidae). Algunas especies depredan “arañitas rojas” (Acari: Tetranychidae), y otras pocas incluyen huevos, larvas y adultos de coleópteros, lepidópteros y trips. Muchos depredadores son generalistas al incluir gran cantidad de especies diferentes en su alimentación, mientras que otras son más específicas. Los depredadores realizan la búsqueda de su presa haciendo un recorrido sobre la hoja siguiendo patrones específicos hasta lograr la captura.

El desarrollo es el segundo aspecto biológico más estudiado en la familia Coccinellidae. Los individuos presentan un período de desarrollo corto y una larga vida adulta. El tiempo que debe transcurrir para que un huevo se desarrolle hasta adulto es de aproximadamente 1 mes, mientras que el adulto puede vivir hasta 1 año, pasando en este estadio el periodo invernal. Lo logran agrupándose en troncos caídos, y resguardándose bajo hojarasca, rocas, corteza de los árboles, o en otros lugares en los que encuentran protección. Una vez llegada la primavera, se dispersan en busca de presas y lugares adecuados para poner sus huevos.

Las especies pueden ser univoltinas, es decir, presentar una generación anual, o tener dos o más generaciones durante el año. Las hembras ponen de veinte a más de 1000 huevos en un periodo de uno a tres meses (Nicholls, 2008).

2.2.2.2 *Harmonia axyridis*

Phyllum: *Arthropoda*

Clase: *Insecta*

Orden: *Coleoptera*

Familia: *Coccinellidae*

Harmonia axyridis (Pallas, 1772), “mariquita asiática” o “vaquita multicolorada asiática” es un coccinélido nativo de Asia Oriental (Pekín, China) (Saini, 2004). Se lo considera un controlador eficaz de plagas de áfidos y de otros insectos de cuerpo blando. Es una especie altamente estudiada a nivel mundial por su voracidad y capacidad de competencia en comparación a las especies de coccinélidos nativos (Lannacone y Perla, 2011).

Harmonia axyridis fue introducida con la finalidad de ser utilizado como CB en Europa, Norteamérica, Sudáfrica, y en Sudamérica en países como Brasil, Chile, Uruguay, Colombia y Argentina. En este último, ingresó por primera vez en la Provincia de Mendoza a fines de la década del 90’ con el objetivo de mejorar el control de la plaga de pulgones del duraznero, realizado aparentemente de manera ineficiente por los predadores nativos (Saini, 2004).

El tamaño de esta especie de coccinélido es mayor al de las especies nativas, y su morfología, variable. El adulto puede medir de 6,5 a 8 mm de longitud en relación a la máxima promedio de la mayoría de los coccinélidos que es de 6 mm. Otro aspecto morfológico distinguible es la marca negra en forma de “M” que tiene en el centro del pronoto. Los élitros pueden ser de color amarillo, ocre o rojizo y presentan 9 manchas negras (Figura 3) (Lannacone y Perla, 2011; Rivera, 2015). También las larvas son más grandes en comparación a otros coccinélidos, y presentan penachos negros y naranjas recubriendo su cuerpo. El ciclo de vida es holometábolo, por lo tanto presentan metamorfosis completa atravesando las etapas de huevo, cuatro estadios larvales, pupa y adulto (Rivera, 2015).



Figura 3: Adulto de *H. axyridis* (Fotografía propia).

Los factores que determinan la voracidad de este insecto son numerosos. En primer lugar, es una especie polífaga y generalista, que además de áfidos incluye en su dieta huevos y larvas de pequeños lepidópteros y de otros coccinélidos, y polen. Esto la posiciona como una invasora altamente depredadora con capacidad para competir y desplazar otras especies afidófagas. En segundo término presenta alta capacidad de dispersión llegando a desplazarse de 100 a 500 km cada año (Iannacone y Perla, 2011). Como tercer factor, la vaquita asiática posee resistencia vigorosa contra diversos patógenos debido a la presencia en la hemolinfa de péptidos antimicrobianos (PAM) (Vilcinskas *et al.*, 2012). Se destaca por tener varias generaciones al año, lo cual favorece su rápida reproducción en comparación a otras especies de coccinélidos. Sin embargo la presencia de *H. axyridis* en el agroecosistema presenta algunas características no deseadas. Como ya se mencionó anteriormente, es capaz de desplazar coccinélidos nativos y otros EN resultando en la disminución de biodiversidad; genera daños a cultivos de frutos blandos; y durante el periodo invernal, el invasor se congrega en viviendas causando molestias a los habitantes (Iannacone y Perla, 2011; Rivera, 2015).

2.2.3 Patógenos

Otro agente utilizado como herramienta de CB de plagas es el que incluye a organismos patógenos. Su importancia en los agroecosistemas se fundamenta por causar enfermedades agudas y fatales en insectos susceptibles, pudiendo regular poblaciones de plagas tanto en el corto como en el largo plazo, sin que, necesariamente se eliminen las poblaciones dado que pueden mantenerlas en niveles por debajo del umbral de daño económico (Alcides y Calvanti, 2012).

Los patógenos son microorganismos parasitarios que se incluyen dentro de distintos grupos: virus, bacterias, hongos, nematodos y protozoos. La transmisión se puede producir por contacto, ingestión, vectores, y poco frecuentemente de padres a la siguiente generación (Nicholls, 2008). Los avances científicos hacen posible la utilización de la infección como mecanismo de control de especies que son plaga, o bien, prevenir el efecto patogénico en insectos benéficos (Calvanti, 2012.).

2.2.3.1 Clasificación de los patógenos

No todos los microorganismos causan infección en los insectos. Esto puede deberse a la resistencia característica del hospedero o a la inhabilidad del microorganismo para sobrevivir y multiplicarse en él. Aquellos capaces de provocar una enfermedad se dividen en patógenos potenciales, facultativos y obligados. Los primeros son incapaces de invadir al hospedero por medio de la pared cuticular o del tracto digestivo, por lo que requieren ayuda para que se reduzca la resistencia del hospedero o se

favorezca su habilidad de penetración. Los patógenos facultativos pueden no invadir al insecto, pero en caso de hacerlo, su reproducción puede ocurrir dentro de él. Sin embargo, la sobrevivencia de ambos, potenciales y facultativos, no depende totalmente del insecto. Estos patógenos son los hongos y las bacterias, y se pueden cultivar fácilmente sobre medios artificiales.

Por último, los patógenos obligados son microorganismos que requieren un insecto vivo para sobrevivir y multiplicarse. Pueden permanecer fuera del insecto en estado de dormancia como esporas, quistes, inclusiones virales, entre otros. Se incluyen en este grupo virus, protozoos y ciertos hongos y bacterias.

2.2.3.2 Hongos entomopatógenos

2.2.3.2.1 Generalidades y taxonomía de los HE

Los HE son microorganismos que parasitan a diferentes grupos de artrópodos, como las arañas y los ácaros, y a distintos órdenes de insectos, causándoles enfermedades conocidas como “micosis”. Entre los órdenes de insectos susceptibles se destacan: Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera (Alean, 2003). La infección del insecto por el HE ocurre principalmente en los estados inmaduros (larvas o ninfas) y de adulto, mientras que los estados de huevo y pupa no son frecuentemente infectados.

A nivel mundial estos microorganismos han sido ampliamente estudiados, habiéndose citado más de 750 especies reunidas en 100 géneros diferentes (Pucheta *et al.*, 2006; Téllez *et al.*, 2009; Schapovaloff, 2012). Estos datos reflejan que son un grupo filogenéticamente diverso; pertenecen al reino Mycota, y pueden tener reproducción sexual y asexual. Las especies patógenas están incluidas principalmente dentro de la división Entomophthoromycota y Ascomycota, con solo algunos representantes en Blastocladiomycota y Basidiomycota (Tabla 1). La atención respecto a su uso como CB se ha centrado en especies de ascomicetos del orden Hypocreales, con una gama de hospedantes relativamente amplia y susceptible de producción en masa. Dentro de los más utilizados se encuentran los géneros *Metarhizium*, *Beauveria* y *Paecilomyces* (Pucheta *et al.*, 2006; Motta y Murcia, 2011).

Tabla 1: Clasificación de las Divisiones más importantes de HE (Ríos, 2017).

División	Clase	Orden	Familia	Género
Entomophthoromycota	Entomophthoromycetes	Entomophthorales	Entomophthoraceae	<i>Batkoa</i> , <i>Entomophaga</i> , <i>Entomophthora</i> , <i>Erynia</i> , <i>Eryniopsis</i> , <i>Furia</i> , <i>Massospora</i> , <i>Orthomyces</i> , <i>Pandora</i> , <i>Strongwellsea</i> , <i>Zoophthora</i> ,
			Ancylistaceae	<i>Ancylistes</i> , <i>Conidiobulus</i> , <i>Macrobiotophthora</i>
			Completoriaceae	<i>Complectoria</i>
	Basidiobolomycetes	Basidiobolus	Basidiobolaceae	<i>Meristacrum</i> , <i>Tabanomyces</i>
			Neozygitomycetes	Neozygitales
				<i>Apterivorax</i> , <i>Neozygites</i> , <i>Thaxterosporium</i>
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Paecilomyces</i>
	Sordariomycetes	Hypocreales	Clavicipitaceae	<i>Archersonia</i> , <i>Hypocrella</i> , <i>Metacordyceps</i> , <i>Metarhizium</i> , <i>Normurea</i> , <i>Pochonia</i> , <i>Regiocrella</i> , <i>Tipo-Paecilomyces</i> , <i>Tipo-Verticillium</i>
			Cordycipitaceae	<i>Beauveria</i> , <i>Cordyceps</i> , <i>Engyodontium</i> , <i>Isaria</i> , <i>Lecanicillium</i> , <i>Simplicillium</i> , <i>Microhilum</i> , <i>Tipo-Mariannaea</i> , <i>Torrubiella</i>
			Ophicordycipitaceae	<i>Culicinomyces</i> , <i>Elaphocordyceps</i> , <i>Hirsutella</i> , <i>Hymenostibe</i> , <i>Metharhiziopsis</i> , <i>Ophiocordiceps</i> , <i>Paraisaria</i> , <i>Sorospora</i> , <i>Syngliocadium</i> , <i>Tipo-Paecilomyces</i> , <i>Tipo-Verticillium</i> , <i>Tolypocladium</i>

No se incluyen por su carácter minoritario los representantes entomopatógenos de las divisiones Blastocladiomycota y Basidiomycota.

2.2.3.2.2 Hongos Entomopatógenos de interés en Control Biológico

El uso de HE como CB es un método conocido desde la antigüedad a partir de observaciones realizadas en ataques producidos por hongos de los géneros *Cordyceps* e *Isaria* sobre gusanos de seda y adultos de homópteros (Kobayashi *et al.*, 1977). Desde entonces, la posibilidad de recurrir a estos organismos como un método alternativo, ha tomado cierta importancia, destacando que prácticamente todos los órdenes de la clase Insecta son susceptibles a ser afectados por HE (Alean, 2003).

Dentro de las principales propiedades que se le atribuyen a los HE se menciona: la fuerte especificidad entre patógeno-hospedante, la casi nula presencia de residuos tóxicos, la persistencia en el tiempo luego de la aplicación, el bajo costo respecto a los productos de síntesis química, el respeto por la biodiversidad del agroecosistema, el alto potencial como fuente de metabolitos para la creación de productos fitosanitarios alternativos, entre otras (Franco *et al.*, 2011).

Como se mencionó con anterioridad, los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* son los considerados de mayor importancia para el CB. Esto se debe a que se encuentran con alta frecuencia en la naturaleza, son efectivos al controlar a especies pertenecientes a órdenes de insectos como Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera y Hemiptera, y han sido utilizados para la formulación de productos comerciales destinados al manejo de plagas de insectos (France *et al.*, 2016).

Beauveria

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

Género: *Beauveria*

El género *Beauveria* es conocido como el HE por excelencia. Fue uno de los primeros HE en ser descubierto al identificarse como el agente infeccioso causante de la muscardina blanca, una enfermedad devastadora que provocaba la muerte del gusano de seda (*Bombyx mori* [Lepidoptera: Bombycidae]), afectando negativamente a la industria europea de la seda en los siglos XVIII y XIX. Este evento dio inicio al estudio de la patología fúngica de los insectos.

Las características que lo posicionan como uno de los HE más estudiados y utilizados como agente de CB se pueden enumerar (Rehner, 2005):

1. Presenta distribución cosmopolita, es de fácil reconocimiento y se encuentra frecuentemente en la naturaleza.
2. Tiene un amplio rango de hospederos dado que infecta a más de 700 especies de insectos.
3. Se puede aislar fácilmente de los cadáveres de sus huéspedes o del suelo utilizando medios simples con antibióticos.

Microscópicamente, la morfología del HE está dada por presentar células conidiógenas globosas a subglobosas (2-3 x 2,0-2,5µm) con un cuello muy corto. Las estructuras conidiógenas pueden estar densamente agrupadas formando sinemas, en espirales o solitarias (Humber, 1998; Castillo *et al.*, 2012). Los conidios son hialinos, lisos y globosos elipsoidales de 2-3 x 2 -2,3 µm. La extensión apical

(raquis) es en zíg-zag, denticulado, y sostiene un conidio sésil en cada dentícula (Figura 4) (Cañedo y Ames, 2004).

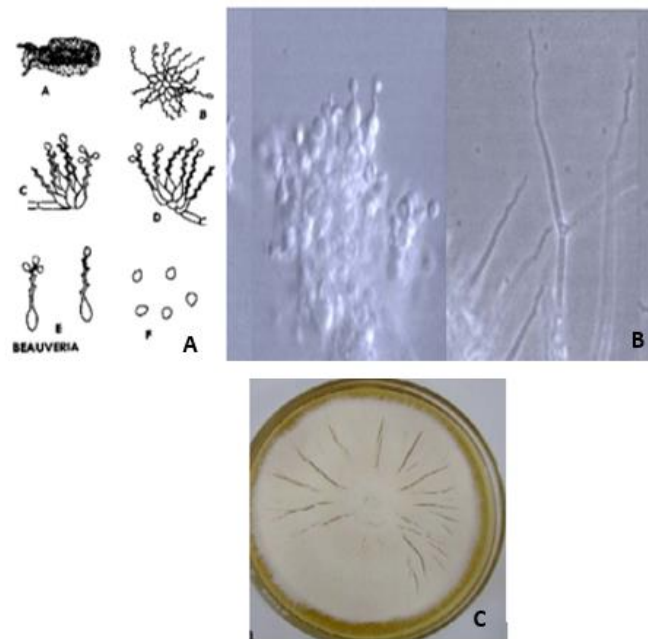


Figura 4: A. Esquema de conidióforos agrupados (B, C y D), conidióforos solitarios (E) y conidios (F) de *B. bassiana* (Barnett y Hunter, 1998). B. Microfotografía de conidióforos y conidios de *B. bassiana* (Tomada por Kouassi, 2001). C. Morfología de la colonia de *Beauveria*.

El desarrollo en medio de cultivo se observa como colonias densas, algodonosas a pulverulentas de bordes definidos, coloración blanca que con el tiempo se vuelven amarillentas a cremosas (Castillo *et al.*, 2012). En el envés de la caja, la colonia se observa rojiza al centro y amarillenta en sus bordes (Cañedo y Ames, 2004)

En los insectos infectados por especies de *Beauveria*, el micelio forma una densa cobertura blanca en la superficie, similar a un moho, que emerge a través del exoesqueleto (Humber, 1998; Castillo *et al.*, 2012).

Metarhizium

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium*

El género cosmopolita *Metarhizium* infecta a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes, muchos de las cuales son importantes plagas agrícolas y forestales (Monzón, 2001). Es además un microorganismo simbiote de plantas, endofítico y micorriza competente.

Por otro lado, su clasificación taxonómica aún no está determinada; la misma requiere estudios de disciplinas como la genética, y otras que hagan su enfoque en las características morfológicas. Diversos autores afirman que este género estaría integrado por especies que satisfacen el concepto biológico

de encontrarse aisladas reproductivamente, pero que es difícil lograr su diferenciación morfológica. A las especies con esta característica se las denomina “crípticas” (Lopez Plantey, 2018 com personal).

Humber (1998), García *et al.* (2011) y Torres de la C. *et al.* (2013) establecieron las características morfológicas de aislados de *Metharizium anisopliae*. Bajo microscopio, se observa que los conidióforos nacen del micelio y presentan una medida de 4 -14 x 1,5 - 2,5 μm . Son simples o agregados. Las fiálides o células conidiógenas de *M. anisopliae* son cilíndricas y se contraen en el ápice adquiriendo forma de botella; miden de 6- 13 x 2- 4 μm . Los conidios son unicelulares de forma alargada, ovoide o cilíndrica. La medida es de 3,5- 9 x 1,5- 3,5 μm ; y están dispuestos en cadenas compactas paralelas (Cañedo y Ames, 2004; Humber 2005, 2012). En medios de cultivo enriquecidos, las colonias se observan aplanadas, “pegadas al medio;” inicialmente son blancas, y al madurar se tornan de colores que van del verde oliva, amarillento al marrón oscuro; y en el envés, del incoloro al marrón (Padilla-Melo *et al.*, 2000; Cañedo y Ames, 2004). La colonia presenta aspecto algodonoso, laxo y de textura variable (Figura 5).

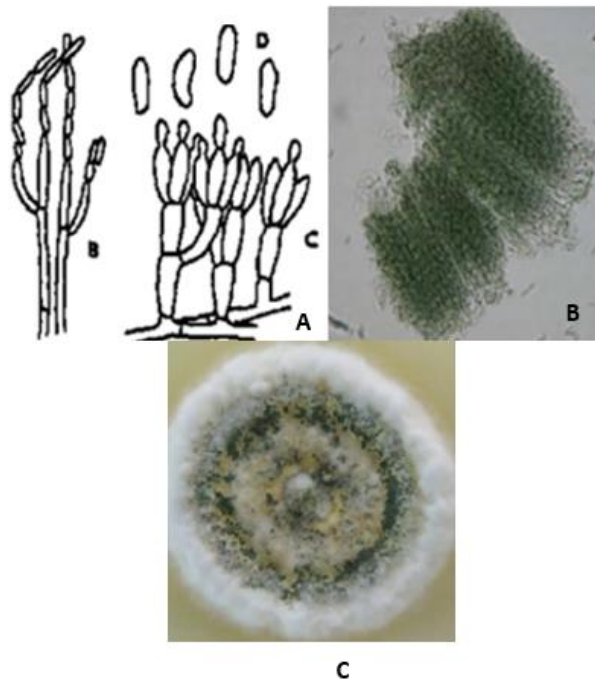


Figura 5: A. Esquema de conidióforos (B y C), y conidios (D) de *Metarhizium* (Barnett y Hunter, 1998). B. Microfotografía de conidios en cadena de *Metarhizium*. C. Morfología de la colonia de *Metarhizium* (Fotografía de: García *et al* 2014).

Paecilomyces (Purpureocillium – Isaria)

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Paecilomyces (Purpureocillium- Isaria)*

El hongo *Paecilomyces* es saprofita y oportunista, habita suelos y ambientes diferentes. Existe una amplia discusión taxonómica respecto a la posibilidad de clasificar a las especies de este género por

sus características morfológicas, dado que pareciera ser un caso más de especies crípticas, como el género tratado anteriormente.

La descripción morfológica bajo el microscopio consiste en conidióforos que pueden ser terminales o nacer en otras partes del micelio, con fiálides en grupos con forma de botella con base ensanchadas y largos cuellos. La longitud de los conidios es de 3.5- 4 μm y tienen forma de cilindro o de limón (Humber, 2012). Desde el punto de vista macroscópico, el color de la colonia es blanquecina y achatada inicialmente, y con el tiempo va tomando una coloración rosada mate y en el envés de las cajas de crecimiento, la misma se vuelve amarillento a pardo claro (Figura 6) (Cañedo y Ames 2004).

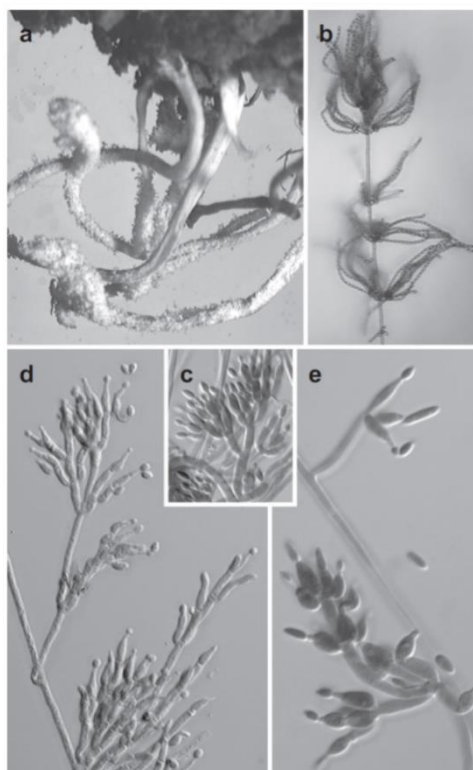


Figura 6: Montaje y observación microscópica del género *Isaria* (antes *Paecilomyces*). (a) Sinema. (b-e) Conidióforos (fiálides) con base ensanchada y cuello extendido. Fuente: Humber (2012), p. 177.

2.2.3.2.3 Factores ambientales que influyen en el establecimiento y la acción de Hongos

Entomopatógenos

Para que una enfermedad causada por un HE inicie y se desarrolle, es necesario que se cumplan ciertas condiciones ambientales. Los principales factores ambientales que afectan la eficiencia de los HE como agentes de CB son la humedad relativa (HR), la temperatura (T) y la radiación solar (RS).

La HR tiene efecto sobre la germinación, la penetración y la reproducción de los HE. El valor necesario de este factor para el desarrollo normal depende, en gran medida, de las condiciones climáticas y microclimáticas de cada hábitat. Se ha demostrado capacidad de germinación de algunos HE en ambientes con una baja HR debido a que fue suficiente en el microhábitat donde llevan a cabo su actividad (Schapovaloff, 2012), o a la presencia del insecto hospedante (Arrubla *et al.*, 2010). En general, las condiciones de HR del microambiente que rodea a los conidios deben superar el 90 % para que ocurra la germinación y penetración del hongo (Ríos, 2017).

Otro factor ambiental clave es la T, porque puede afectar la germinación de las esporas, el desarrollo y la penetración del tubo germinativo, la colonización y la reproducción. Los HE no poseen condiciones biológicas para defenderse de las grandes variaciones de T por lo cual este factor puede actuar como

limitante. Los requerimientos térmicos de los HE son variables en función de la especie, cepa y fase de desarrollo. En general, las esporas germinan entre 15 y 35 °C, siendo el rango óptimo entre 20 y 30 °C; sin embargo, existe una temperatura ideal para cada patógeno y para cada fase del ciclo en la relación con su hospedante. La esporulación es inhibida a temperaturas inferiores a 10 °C y superiores a 35 °C.

Para evaluar el efecto de la RS sobre los patógenos y sobre la ocurrencia de las enfermedades es necesario considerar: el espectro de luz visible con sus diferentes longitudes de onda (luz verde, amarilla, azul, etc.), el fotoperiodo, y la faja de luz ultravioleta (UV) germicida (Lecuona, 1996). Esta última es la banda del espectro solar más perjudicial y mutagénica para los procesos biológicos, por lo que la exposición del HE a UV afecta la persistencia de los propágulos. Se ha observado que el crecimiento y esporulación es retrasado por la RS, y que la nubosidad tiene un papel importante en el desarrollo de las epizootias causadas por HE (Schapovaloff, 2012).

2.2.3.2.4 Mecanismo de infección de los HE

El desarrollo de la micosis se produce por un mecanismo único en el cual el patógeno no necesita ser ingerido por el insecto, dado que puede infectarlo directamente a través de la penetración de la cutícula (Motta y Murcia, 2011). El proceso puede ser explicado en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele, y (3) desarrollo del hongo, generalmente con la muerte del insecto (Figura 7).

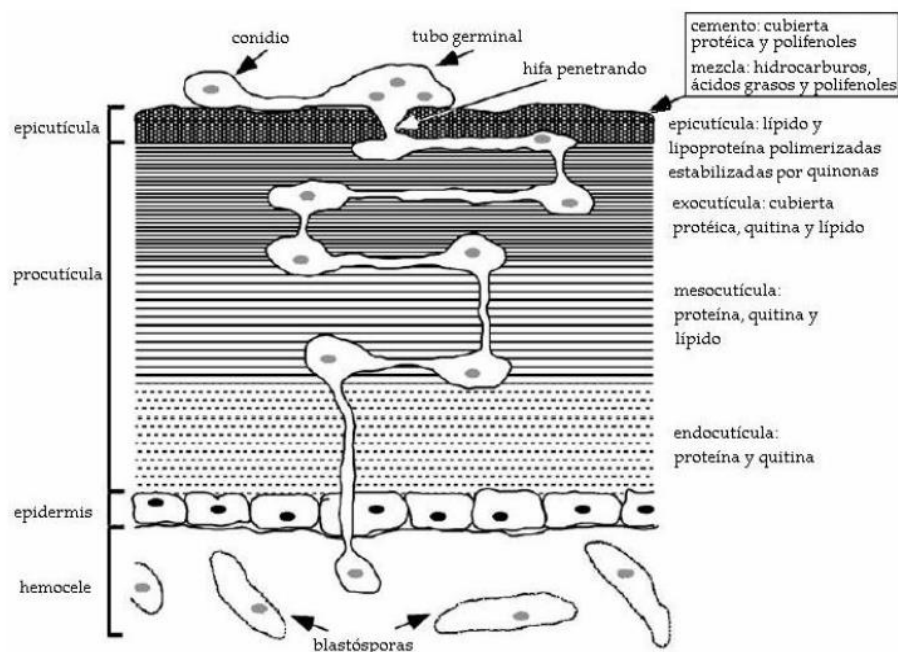


Figura 7: Estructura de la cutícula del insecto y mecanismo de penetración del HE (Schapovaloff, 2012, modificado de Duperchy, 2003).

1. Adhesión y germinación de los propágulos infecciosos en la cutícula del insecto.

El mecanismo inicia cuando los propágulos infecciosos (conidios o esporas) se hidratan y posteriormente se adhieren a la cutícula del insecto, o a las aberturas corporales, como la cavidad bucal, membranas intersegmentales o espiráculos, entre otros. Esto se debe a las propiedades físicas, químicas y electrostáticas tanto de la superficie del conidio como de la cutícula.

La adhesión puede o no ser específica. Hay ciertas especies de HE que presentan glicoproteínas (como lectinas), mucopolisacáridos o enzimas (esterasas y lipasas) que facilitan la adhesión del propágulo a sitios específicos de la capa externa del insecto (Alean, 2003; Schapovaloff, 2012).

Si las condiciones ambientales (HR, T y RS) y nutricionales son favorables, ocurre la germinación. En esta fase el propágulo infectivo emite uno o varios tubos germinativos pequeños, y en algunos casos forma un apresorio (estructura de anclaje). Con ellos el HE ejerce una presión mecánica hacia el interior del insecto facilitando la invasión (Motta y Murcia, 2011). El apresorio puede ayudar a la penetración también por actividad enzimática en el ápice del mismo (Schapovaloff, 2012). Los tubos germinales al crecer y alargarse dan origen a las hifas que permitirán la penetración. Cuando la germinación se produce en los fluidos digestivos, la hifa germinativa puede destruirse, por lo que el insecto no muere de micosis sino a causa de toxinas.

El éxito de esta primera etapa no depende necesariamente del porcentaje de germinación, sino de la duración y del modo de germinación, de la agresividad del hongo, del tipo de espora y de la susceptibilidad del hospedante (Alean, 2003; Cañedo y Ames, 2004; Schapovaloff, 2012).

2. Penetración dentro del hemocele

La segunda etapa está ligada a dos mecanismos, uno físico y otro químico. El primero consiste en la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo generando un quiebre de las áreas esclerotizadas y membranosas de la superficie externa del insecto, con la consecuente deformación de la cutícula. Por su parte, el mecanismo químico consiste en la degradación enzimática de la cutícula por medio de aminopeptidasas, esterasas, proteasas, lipasas y quitinasas.

Otros factores que influyen son las propiedades de la cutícula, como el grosor y la esclerotización, la presencia de sustancias anti fúngicas y nutricionales del tegumento, y el estado de desarrollo del insecto (Schapovaloff, 2012).

3. Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto

La última fase infectiva se produce cuando el HE alcanza el hemocele del insecto y produce formas miceliales unicelulares llamadas blastosporas. Estas estructuras se multiplican y dispersan rápidamente por el interior del insecto, otorgándole al patógeno capacidad para evitar las barreras del sistema inmune del hospedero. La muerte del insecto ocurre por la secreción de sustancias tóxicas denominadas micotoxinas (en Ascomycotas) o por la disminución de nutrientes en la hemolinfa y la colonización de tejidos (en Entomophthoromycotina).

Previo a la muerte, el insecto comienza a mostrar síntomas fisiológicos debidos a la infección como: convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados (deja de alimentarse, reduce su movimiento), entrando en un estado letárgico (Alean, 2003; Cañedo y Ames, 2004; Schapovaloff, 2012; Téllez *et al.*, 2009).

Finalmente, se desarrolla la fase saprofitica en la cual el hongo crece formando masas miceliales que salen al exterior principalmente por regiones intersegmentarias y por aberturas (espiráculos, boca y ano), esporulando y produciendo inóculo para infectar a otros insectos. Como se describió anteriormente, en esta última etapa se requieren valores de humedad superiores al 90% para que se produzca la germinación y esporulación, actuando dicho factor como limitante. Posteriormente, si las condiciones ambientales no son favorables, el hongo permanece dentro del insecto y el tegumento no sufre modificación alguna (Cañedo y Ames, 2004).

2.2.3.2.5 Mecanismos de defensa de los insectos

Una vez que la hifa infectiva del HE llega al hemocele del insecto en la segunda etapa del mecanismo de infección, el microorganismo debe vencer una serie de barreras establecidas por el huésped para continuar con el desarrollo de la enfermedad.

Téllez *et al.* (2009) describieron tres posibles mecanismos de defensa establecidos por el insecto. El primero, como ya se mencionó, es la cutícula. La misma es una estructura rígida que recubre la superficie externa, y está conformada por dos capas: la epicutícula y la procutícula. La función de la primera es evitar pérdida de agua por transpiración, y está compuesta principalmente por grasas, ceras y lipoproteínas. La procutícula constituye el 95% de la estructura cuticular y su composición está dada por quitinas y proteínas estructurales, que actúan como una barrera física.

La segunda oposición a la micosis es el sistema inmune del insecto, conformado por el sistema humoral y el sistema celular, que le permite detectar agentes extraños. El primero está integrado por PAM y otras moléculas, que circulan en el hemocele y en la cutícula del insecto, y que tienen la capacidad de inactivar agentes patógenos cuando ingresan al organismo. Tal como se menciona en el apartado 2.3.1.2, Vilcinskas *et al.* (2012) descubrieron en la hemolinfa de *Harmonia axyridis* un metabolito secundario con actividad antibacteriana de amplio espectro *in vitro* denominado harmonina ((17R, 9Z)-1,17-diaminooctadec-9-eno), y una serie de genes que codifican PAM, los cuales confieren resistencia a patógenos fúngicos. Por su parte, el sistema celular está constituido por hemocitos que pueden reconocer elementos extraños y activar la producción de PAM.

Otras estrategias de defensa están relacionadas con la etología del insecto y la densidad poblacional. El fenómeno denominado “profilaxis dependiente de la densidad”, explica que la selección natural favorece a las poblaciones que crecen hacinadas respecto a las que se desarrollan en bajas densidades. Esto se debe a que las condiciones de hacinamiento permiten establecer una actividad antimicrobiana potenciada en los sistemas de defensa. También se han observado individuos infectados por HE capaces de aumentar el tiempo de exposición al sol incrementando la temperatura corporal, deteniendo el desarrollo de las esporas y promoviendo la acción de su sistema inmune (Téllez *et al.* 2009).

En insectos sociales se han identificado tres adaptaciones en el comportamiento para sobrevivir a enfermedades por patógenos. En el caso de las abejas se ha observado que los individuos de la misma colmena son capaces de reconocer a los individuos enfermos y eliminarlos. Además producen una “fiebre social”, que consiste en el aglomeramiento de las obreras alrededor del individuo enfermo para poder eliminar el patógeno. El segundo mecanismo se produce en el individuo infectado, que abandona la colmena o se aleja de las larvas o de la reina para evitar la transmisión del patógeno. Por último, la tercera adaptación consiste en una interacción alterada entre individuos sanos y enfermos, que puede resultar en un tipo de “vacunación” colectiva de los sanos, aumentando la inmunidad (Téllez *et al.* 2009).

2.3 La polinización y *Apis mellifera*

La polinización es el proceso de transferencia de polen desde los estambres de una flor hasta el estigma de la misma u otra flor. De esta manera se produce la fecundación con la consecuente producción de frutos (FAO, 2014). La reproducción sexual se realiza por fecundación cruzada, es decir, cuando la transferencia de polen ocurre entre individuos diferentes. En cambio, la reproducción asexual se produce por autopolinización, con la consecuente generación de clones de la misma planta (Figura 8).

Existen vectores o agentes abióticos (viento y agua), y bióticos que llevan a cabo la polinización cruzada. Las plantas anemófilas son las que dependen del viento como agente dispersor del polen, mientras que la polinización por agua es la menos frecuente, pero necesaria para las plantas acuáticas.

Por su parte, los animales son los agentes bióticos que facilitan la fecundación cruzada de muchas especies vegetales. Entre ellos se destacan los mamíferos, las aves y los reptiles, siendo el grupo de los insectos el más destacado. Dentro de este grupo, la abeja es considerada como el polinizador universal.

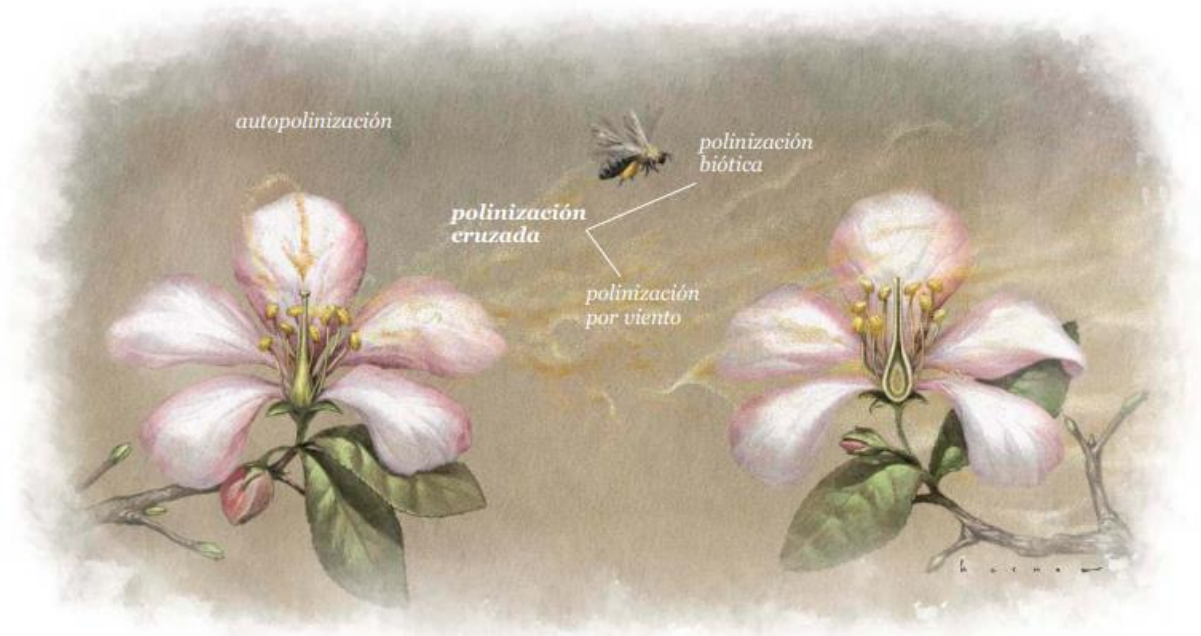


Figura 8: Autopolinización y polinización cruzada (Observatorio de Agentes Polinizadores, Apolo).

Apis mellifera

Phyllum: Arthropoda

Subphyllum: Mandibulata

Clase: Insecta

Subclase: Holometabola

Orden: Hymenoptera

Familia: Apidae

Las abejas son insectos de gran importancia económica y ecológica en los agroecosistemas, debido a que gran parte de los alimentos que se consumen y se comercializan masivamente, dependen directa o indirectamente de la polinización que realizan. Existen diferentes especies polinizadoras, pero la más reconocida a nivel mundial es *Apis mellifera* L., "abeja europea" (Figura 9), utilizada para la producción de miel, cera y resinas, entre otros productos.



HYMENOPTERA, Apidae
 Abeja doméstica (*Apis mellifera* L., 1758)
 libando en la inflorescencia de un sauce (*Salix* L. sp.)
 Foto: Juan Manuel Losada Rodríguez,
 ribera del río Miño (Ourense)

HYMENOPTERA, Apidae
 Abeja doméstica (*Apis mellifera* L., 1758) en vuelo
 cargada de polen
 Foto: David Martín Albaladejo,
 Torres de la Alameda (Madrid)

Figura 9: Fotografías de *A. mellifera* realizando la polinización (Observatorio de Agentes Polinizadores).

La especie *A. mellifera* pertenece al orden Hymenoptera, y son insectos sociales que se agrupan en colonias muy pobladas (una colmena tipo puede tener 60000 abejas), donde recolectan grandes cantidades de polen y néctar. Presentan un alto grado de organización con diferenciación de castas (obreras, zánganos y reinas) y realizan una danza peculiar para establecer comunicación entre ellas respecto a la localización de alimento (Observatorio de Agentes Polinizadores).

Quero, A (2004) y Dadant *et al.* (1975) realizan una descripción morfológica de la abeja. La misma consta, en primer lugar, de la cabeza, donde se sitúan estructuras relacionadas con la visión y el olfato, y los órganos implicados en la captura y procesamiento del alimento (Figura 10). En la parte superior de la cabeza tienen tres ocelos u ojos simples, mientras que en los laterales se sitúan dos ojos compuestos. En el centro de esta parte del cuerpo se localizan un par de antenas, en las que residen los sentidos del tacto y del olfato. La boca está rodeada por un par de mandíbulas, y de ella se extiende una probóscide o trompa.

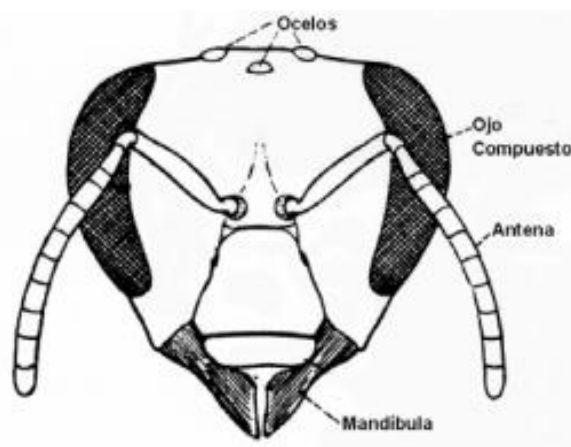


Figura 10: Cabeza de *A. mellifera* y las principales estructuras relacionadas a la visión, el olfato y la alimentación. Fuente: Quero, A (2004)

El tórax es la parte central del cuerpo, y en él se insertan las 3 pares de patas y los 2 pares de alas. Su cavidad encierra musculatura relacionada con los apéndices de la locomoción, y los músculos que mueven la cabeza y el abdomen. Esta parte central del cuerpo está formada por los segmentos

protórax, mesotórax y metatórax, y el propódeo que es el primer segmento del abdomen que se une al tórax. Un par de patas se inserta en cada segmento, y las alas se ensamblan a partir del segundo y el tercer segmento.

La parte del cuerpo posterior de la abeja se denomina abdomen, y está formado por 7 segmentos visibles que encierran órganos esenciales. Entre ellos se destacan las glándulas céreas, las glándulas odoríferas, y el aparato defensivo, que consta de dos glándulas productoras de veneno, una vesícula que lo almacena, y un aguijón con el que inocula al enemigo. Esta última estructura consta de 3 piezas independientes: el estilete, las lancetas y los lóbulos de la vaina (Figura 11).

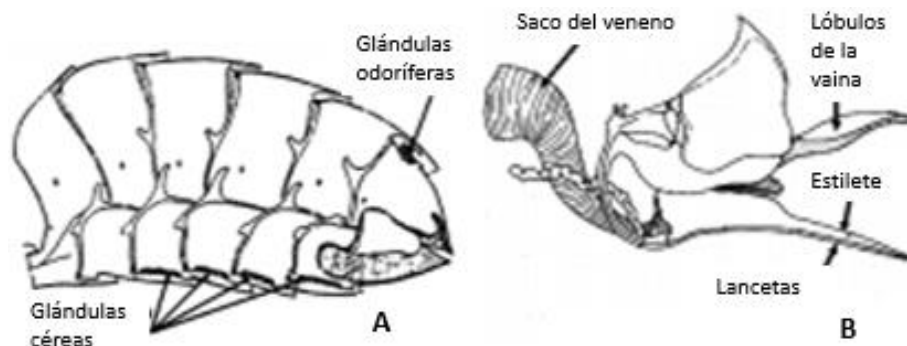


Figura 11: A. Abdomen de la abeja obrera. B. El aguijón de la abeja obrera. Fuente: Quero, A (2004)

En lo que hace al desarrollo, las castas de hembras (reinas y obreras) se reproducen sexualmente, mientras que en los machos (zánganos) la reproducción es asexual. El desarrollo postembrionario también es diferencial según el tipo de casta. El insecto presenta ciclo holometábolo: comienza su vida como huevo, que son alargados de aproximadamente 15 mm de longitud, redondeados en las puntas y convexos. Luego atraviesa una fase de larva que se caracteriza por ser acéfala, ápoda y de color blanco nacarado; alcanzando posteriormente el estadio de pupa, que dura alrededor de 12 días y es cuando se produce la metamorfosis dando origen al adulto o imago.

Existen distintos factores que pueden afectar negativamente la diversidad y abundancia de estos polinizadores. Entre ellos, se pueden mencionar la fragmentación y/o pérdida del hábitat, la intensificación de usos de suelo, la introducción de especies exóticas, el cambio climático y la utilización de productos químicos de síntesis u organismos de CB para un MIP. Esto último es consecuencia del desconocimiento existente respecto a la interacción interespecífica entre las especies utilizadas como CB y los organismos presentes en el agroecosistema, considerando tanto las poblaciones plagas como los insectos benéficos o no-objetivo.

2.4 Interacciones entre los HE e insectos no-objetivo

Los agroecosistemas presentan estructuras y funcionamientos complejos (Martín López *et al.* 2007). Asimismo, no se conoce la totalidad del efecto de las interacciones entre los organismos que lo componen. No obstante, se han determinado efectos sinérgicos y antagónicos de los HE en las especies benéficas o no objetivo (Roy y Pell, 2000). Un organismo no objetivo en el AE es aquel no considerado plaga, y que por lo tanto, no forma parte de un MIP. Los EN de plagas agrícolas y los polinizadores se ubican dentro de este grupo.

Las interacciones sinérgicas de los HE con especies benéficas resultarían en el aumento de la mortalidad de los insectos plaga respecto a la suma de las mortalidades individuales debidas a la acción de cada uno. Por otro lado, las interacciones antagónicas se verían reflejadas en una disminución de la

mortalidad de los insectos plaga respecto al total de las mortalidades individuales ocasionadas por los agentes de CB (Roy y Pell, 2000).

La acción de HE en los EN depredadores podría tener doble impacto. Por un lado, actuando como patógeno del propio individuo, y, por el otro, disminuyendo la cantidad de presas disponibles (Ball *et al.* 1994). En el caso de las abejas, podría ocurrir un impacto negativo más complejo porque la enfermedad de un individuo podría derivar en la transmisión a toda la colmena al ser la abeja un insecto social.

Vilcinskis *et al.* (2012) identificaron péptidos antimicrobianos en la hemolinfa del EN *H. axyridis* que le confiere resistencia a los patógenos fúngicos. Por su parte, los estudios realizados por Soto (2015) indican que *A. mellifera* puede actuar como vector de *B. bassiana* sin sufrir infección debido a la exposición directa del hongo.

Por todo lo expuesto, es fundamental estudiar las interacciones específicas que podrían existir entre distintas cepas de los géneros de HE *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* procedentes de suelos de viñedos del Oeste argentino sobre los insectos benéficos *H. axyridis* y *A. mellifera* presentes en el mismo AE.

2.5 Control biológico y polinización como servicios ecosistémicos

Los ecosistemas naturales suministran a la humanidad numerosos recursos y procesos de los cuales el hombre obtiene beneficios. Estos componentes se denominan colectivamente Servicios Ecosistémicos (SE) (Rosas, 2016), y pueden clasificarse en cuatro categorías según la Iniciativa Global Economía de Ecosistemas y Biodiversidad (TEEB, por sus siglas en inglés):

De provisión: son los productos o bienes tangibles y consuntivos obtenidos del ecosistema, como ser el alimento y el agua, y la producción de materias primas y energía;

De hábitat y soporte: son los componentes relativos al soporte vital para todas las especies;

Culturales: ligados a los valores humanos, su identidad y su comportamiento, como son los beneficios educativos, científicos, estéticos y artísticos; y

De regulación: son funciones no consuntivas que regulan procesos como la calidad del aire, secuestro de carbono, moderación de eventos climáticos, descontaminación de aguas servidas, reciclaje de nutrientes, prevención de erosión, polinización y control biológico.

La Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) considera a la polinización como un SE vital que posibilita la producción de alimentos y los medios de vida de los seres humanos. Por su parte, el aprovechamiento del control biológico tiene su origen en los antiguos agricultores chinos, cuando observaron que las hormigas eran depredadores efectivos de muchas plagas de los cítricos, razón por la cual aumentaban sus poblaciones colectando nidos de hormigas depredadoras en hábitats naturales cercanos y los colocaban en sus huertos, con el propósito de controlar las plagas (Abouhamad, 2017).

En la presente Tesina, la especie polinizadora *Apis mellifera* y la depredadora *Harmonia axyridis* han sido consideradas como modelos biológicos, al brindar servicios ecosistémicos de regulación en los agroecosistemas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Determinación de la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos sobre *Harmonia axyridis* mediante la técnica de aspersión

Recolección de adultos de *H. axyridis* a campo

Se recolectaron en el predio productivo de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) (Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina), en los períodos vegetativo e invernal, adultos de la especie *H. axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) para su posterior utilización en bioensayos. El rastrillaje se inició desde el extremo noreste de la parcela experimental de duraznos, finalizando en el extremo suroeste de la misma.

El material recolectado se llevó al laboratorio de Fitopatología (Cátedra de Fitopatología, Departamento de Ciencias Biológicas, FCA). Se acondicionó en recipientes plásticos agujereados y tapados con mallas de tela vegetal para la aireación, bajo condiciones controladas (Temperatura= 25°C, Humedad \geq 70% y Fotoperiodo=12:12). La finalidad fue obtener un pool de individuos lo suficientemente importante para el desarrollo de los bioensayos de patogenicidad (Figura 12).

Los adultos se mantuvieron mediante alimentación artificial (solución saturada de sacarosa) y presas vivas (áfidos).



Figura 12: Adultos de *H. axyridis* acondicionados en recipientes plásticos para la realización de bioensayos

Cepas de HE utilizadas

Se estudió la patogenicidad de 10 cepas de HE, de los Géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* (Tabla 2) aislados de muestras de suelos de viñedos de distintas provincias del Oeste de Argentina (Río Negro, Neuquén, Mendoza, San Juan, La Rioja y Salta). Las mismas fueron encontradas, caracterizadas morfo-fisiológicamente e identificadas a nivel molecular por el Director de la presente Tesina, el M.Sc. Ing. Agr. López Plantey para la realización de su Tesis Doctoral.

Tabla 2: Listado y nomenclatura de las cepas de hongos entomopatógenos evaluados sobre adultos de *H. axyridis*.

Nº	CEPA	GÉNERO
1	BsoilAR-4.1(2)	<i>Beauveria</i>
2	PsoilAR-24.3	<i>Paecilomyces</i>
3	MsoilAR-2.5(2)	<i>Metarhizium</i>
4	MsoilAR-4.3	<i>Metarhizium</i>
5	MsoilAR-18.5(3)	<i>Metarhizium</i>
6	MsoilAR-14.3	<i>Metarhizium</i>
7	MsoilAR-18.5(2)	<i>Metarhizium</i>
8	MsoilAR-2.3(2)	<i>Metarhizium</i>
9	MsoilAR-2.3(4)	<i>Metarhizium</i>
10	MsoilAR-16.3	<i>Metarhizium</i>

El crecimiento y la multiplicación de todos los hongos se realizó en placas de Petri con medio AA (Agar 12 g.L⁻¹, Avena 40 g y estreptomina 50 mg), y se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente para favorecer el desarrollo micelial y la esporulación.

Bioensayo de patogenicidad

Las suspensiones de conidios de cada cepa se prepararon en condiciones estériles y se fijaron a una concentración de 10⁷ conidios. mL⁻¹ en agua destilada estéril y Tween80[®] (0,01% v/v) (polisorbato) para evitar la aglomeración de conidios. Luego se colocaron 5 adultos de *H. axyridis* en cajas de Petri de 15 cm de diámetro, los cuales fueron asperjados con 2mL de cada suspensión. La determinación del número de conidios por volumen se realizó con la Cámara de Neubauer. Se hicieron tres repeticiones por cada cepa. Dentro de cada caja de Petri se colocó un algodón estéril embebido en una solución saturada de sacarosa con el objeto de brindar alimento a los insectos adultos durante el bioensayo. Las cajas de Petri se conservaron bajo condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60% HR) y fotoperiodo (16:8) por 7 días.

Se realizó un tratamiento testigo, ejecutado de la misma forma explicada asperjándolo sólo con agua estéril y Tween80[®] (0,001% v/v).

Diariamente se observó la presencia de individuos muertos, realizándose conteo de los mismos. El individuo que presentó sintomatologías de infección, fue retirado y conservado en cámara húmeda (HR >80%) para favorecer la emergencia de las fructificaciones.

Índice de Mortandad

Los datos de individuos muertos se registraron en una tabla Excel 2013 y se determinó posteriormente el Índice de Mortandad (IM) mediante la fórmula:

$$IM = \frac{AS_T - AS_B}{AS_T}$$

Donde (IM): Índice de Mortandad, (AS_T): número de adultos sobrevivientes en el testigo, (AS_B): número de adultos sobrevivientes en el bioensayo.

Análisis estadístico

Se analizaron los resultados obtenidos con el software InfoStat 2017p® mediante estadística descriptiva por medio de la determinación de la media muestral (\bar{X}) y la desviación estándar (D.E.).

3.2 Determinación de la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos sobre *Harmonia axyridis* mediante técnica de contacto

La metodología relacionada a la recolección de adultos de *H. axyridis* a campo, las cepas de HE utilizadas, el cálculo del Índice de Mortandad, y los análisis estadísticos, fue igual a la detallada en el punto anterior; existiendo diferencia en el bioensayo de patogenicidad. En este caso, se realizó el método de inoculación por "Contacto" (Pizzuolo *et al.*, 2002).

Se transfirieron 5 individuos adultos por cada una de las 3 repeticiones, a una caja de Petri de 9 cm de diámetro con un disco de papel secante (del diámetro de la caja) en el fondo. El mismo fue previamente asperjado con 2 mL de una suspensión de conidios del orden de 10^7 mL⁻¹ (agua destilada estéril, Tween80® 0,01% v/v) y secado posteriormente a temperatura ambiente por, al menos, 20 minutos (Figura 13).

Las cajas de Petri se conservaron bajo condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60% HR) y fotoperiodo (16:8) por 7 días. Dentro de cada caja Petri, se colocó un algodón estéril embebido en una solución saturada de glucosa con el objeto de brindar alimento a los insectos adultos durante el bioensayo.

Se realizó un tratamiento testigo, ejecutado de la misma forma explicada usando sólo agua estéril con Tween80® (0,001% v/v).

Diariamente se observó y contabilizó la presencia de individuos muertos. El individuo que presentó sintomatologías de infección fue retirado y conservado en cámara húmeda (HR >80%) para favorecer la emergencia de las fructificaciones del HE.



Figura 13: Método de inoculación por contacto en adultos de *H. axyridis*.

3.3 Determinación de la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos sobre *Apis mellifera* mediante la técnica de aspersión

Recolección de adultos de *A. mellifera* a campo

Se recolectaron individuos adultos de *A. mellifera* de las colmenas ubicadas en el apiario de la FCA (Figura 14). Los mismos se llevaron al laboratorio en frascos de vidrio para su posterior infección. La manipulación de los adultos se facilitó mediante uso de hielo seco para generar una atmósfera pobre en O₂, y así bajar su actividad y resguardar la seguridad durante todo el bioensayo. Los tiempos de exposición al hielo seco se determinaron previamente para no causar daños letales a los individuos.



Figura 14: Adultos de *A. mellifera* recolectados en el apiario de la FCA.

Cepas de HE utilizadas

Se estudió la patogenicidad de 24 aislados de HE de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* (Tabla 3) presentes en suelos de viñedos de distintas provincias de Argentina (Río Negro, Neuquén, Mendoza, San Juan, La Rioja y Salta). Los mismos fueron encontrados, caracterizados morfo-fisiológicamente e identificados a nivel molecular por el M.Sc. Ing. Agr. López Plantey para la realización de su Tesis Doctoral. También se evaluó una cepa comercial argentina denominada en este estudio ARG (*Beauveria bassiana* cepa SP-B/04-42, WP, 10⁵ conidios. g⁻¹) y dos cepas italianas del género *Beauveria* aisladas de especies de la familia Curculionidae (Coleoptera), identificadas como RINCO y CCH.

Tabla 3: Listado y nomenclatura de las cepas de hongos entomopatógenos evaluados sobre adultos de *Apis mellifera*.

Nº	CEPA	GÉNERO
1	ACA	<i>Beauveria</i>
2	ARG	<i>Beauveria</i>
3	CCH	<i>Beauveria</i>
4	RINCO	<i>Beauveria</i>
5	BinsAR-1	<i>Beauveria</i>
6	BinsAR-2	<i>Beauveria</i>
7	BsoilAR-4.1(2)	<i>Beauveria</i>
8	PsoilAR-4.1(2)	<i>Paecilomyces</i>
9	PsoilAR-2.3(4)	<i>Paecilomyces</i>

10	PsoilAR-24.3	<i>Paecilomyces</i>
11	MsoilAR-2.5(2)	<i>Metarhizium</i>
12	MsoilAR-4.3	<i>Metarhizium</i>
13	MsoilAR-18.5(3)	<i>Metarhizium</i>
14	MsoilAR-10	<i>Metarhizium</i>
15	MsoilAR-14.3	<i>Metarhizium</i>
16	MsoilAR-15.1	<i>Metarhizium</i>
17	MsoilAR-15.3	<i>Metarhizium</i>
18	MsoilAR-16.3	<i>Metarhizium</i>
19	MsoilAR-2.4(2)	<i>Metarhizium</i>
20	MsoilAR-2.3(1)	<i>Metarhizium</i>
21	MsoilAR-2.3(3)	<i>Metarhizium</i>
22	MsoilAR-2.3(2)	<i>Metarhizium</i>
23	MsoilAR-2.3(4)	<i>Metarhizium</i>
24	MsoilAR-17.9	<i>Metarhizium</i>

Bioensayos de patogenicidad

Se realizaron bioensayos de patogenicidad sobre adultos *A. mellifera* mediante el método de inoculación por aspersión directa: "Aspersión" (Pizzuolo *et al.*, 2002), ejecutando tres repeticiones por cada aislado.

Se utilizaron cinco individuos adultos por cada una de las 3 repeticiones. Dentro de una caja de Petri estéril se los asperjó con 2 mL de una suspensión de conidios del orden de 10^7 . mL⁻¹ (agua destilada estéril, Tween80® 0,01% v/v) (Figura 15, ejemplo 1). En todos los métodos de inoculación la determinación del número de conidios por volumen de agua estéril se realizó con la Cámara de Neubauer.

Posteriormente, los individuos adultos infectados se transfirieron a una caja de Petri de 9 cm de diámetro en la cual previamente se le incorporó un fondo de papel secante estéril, junto con un algodón estéril embebido con una fuente alimenticia (solución saturada de hidromiel) y un algodón estéril embebido con una fuente de hidratación (agua destilada estéril).

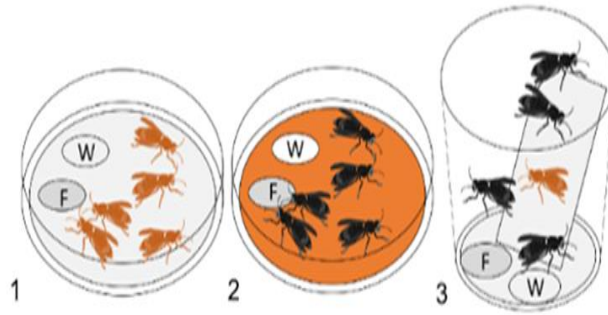


Figura 15: Métodos de inoculación utilizados en el bioensayo de *A. mellifera*: 1. Infección por aspersión directa; 2. Infección por contacto; 3. Infección por transferencia (F) alimento; (W) agua. Fuente: Poidatz et al. (2018).

Se realizó un tratamiento testigo, ejecutado de la misma forma explicada usando sólo agua estéril con Tween80® (0,001% v/v).

Los individuos utilizados fueron supervisados previamente que no manifestasen síntomas de intoxicación por CO₂.

Todas las unidades de muestreo se conservaron por 7 días consecutivos en condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60% HR) y fotoperiodo (16:8). Diariamente se determinó la presencia de individuos muertos, que fueron transferidos a cámara húmeda (HR >80%) para favorecer la emergencia de las fructificaciones del hongo (Figura 16).



Figura 16: Individuos muertos de *A. mellifera* en cámara húmeda.

Índice de Mortandad

El número de insectos muertos se registró en una tabla Excel 2013 para determinar posteriormente el Índice de Mortandad (IM) mediante la fórmula:

$$IM = \frac{AS_T - AS_B}{AS_T}$$

Donde (IM): Índice de Mortandad, (AS_T): número de adultos sobrevivientes en el testigo, (AS_B): número de adultos sobrevivientes en el bioensayo.

Análisis estadístico

Se analizaron los resultados obtenidos con el software InfoStat 2017p® mediante estadística descriptiva por medio de la determinación de la media muestral (\bar{x}) y la desviación estándar (D.E.).

3.4 Determinación de la patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos sobre *Apis mellifera* mediante la técnica de contacto

Se realizaron bioensayos de patogenicidad sobre adultos *A. mellifera* mediante el método por contacto con una superficie inoculada: "Contacto" (Pizzuolo *et al.*, 2002). La única variación en la metodología respecto al ítem anterior fue la técnica de inoculación. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento.

Se transfirieron 5 individuos adultos por repetición a una caja de Petri de 9 cm de diámetro que poseía en el fondo un disco de papel secante (del diámetro de la caja) (Figura 15, ejemplo 2). El mismo fue previamente asperjado con 2 mL de una suspensión de conidios del orden de 10^7 . mL⁻¹ (agua destilada estéril, Tween80® 0,01% v/v) y secado a temperatura ambiente por, al menos, 20 minutos (Figura 17). Dentro de cada unidad de muestreo (caja de Petri), se colocó un algodón estéril embebido con una fuente alimenticia (solución satura de hidromiel) y un algodón estéril embebido con una fuente de hidratación (agua destilada estéril).

Se realizó un tratamiento testigo, ejecutado de la misma forma explicada usando sólo agua estéril con Tween80® (0,001% v/v).



Figura 17: Método de infección por contacto en *A. mellifera*.

Los individuos utilizados fueron supervisados previamente que no manifestasen síntomas de intoxicación por CO₂.

Todas las unidades de muestreo se conservaron por 7 días consecutivos en condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60% HR) y fotoperiodo (16:8). Diariamente se determinó la presencia de individuos muertos, que fueron transferidos a cámara húmeda (HR >80%) para favorecer la emergencia de las fructificaciones del hongo (Figura 17).

3.5 Determinación de la patogenicidad de las cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Apis mellifera* mediante la técnica de transferencia

Al ser la "abeja europea" un insecto social, se confeccionó la forma de inoculación por "Transferencia", el resto del ensayo se realizó con la metodología explicada en el ítem 3.3. La finalidad de este tratamiento fue representar otro posible medio de infección. Se realizaron tres repeticiones por cada capa.

Se asperjó un individuo adulto de *A. mellifera* (previamente marcado en el mesonoto -tórax- con pintura apta para apicultura), con 400 µL de una suspensión de conidios del orden de 10^7 . mL⁻¹ (agua destilada estéril, Tween80® 0,01% v/v) (Figura 16, ejemplo 3). Inmediatamente la abeja inoculada fue

transferida a un recipiente plástico de 10 cm de alto y 10 cm de diámetro en cuyo interior se encontraban 4 individuos adultos no tratados, un cartón estéril como soporte de los mismos, un algodón estéril embebido con una fuente alimenticia (solución saturada de hidromiel) y un algodón estéril embebido con una fuente de hidratación (agua destilada estéril) (Figura 18).



Figura 18: Recipientes del método por contacto y por transferencia en condiciones controladas.

Se realizó un tratamiento testigo, ejecutado de la misma forma explicada usando sólo agua estéril con Tween80® (0,001% v/v).

Los individuos utilizados fueron supervisados previamente que no manifestasen síntomas de intoxicación por CO₂.

Todas las unidades de muestreo se conservaron por 7 días consecutivos en condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60% HR) y fotoperiodo (16:8). Diariamente se determinó la presencia de individuos muertos, que fueron transferidos a cámara húmeda (HR >80%) para favorecer la emergencia de las fructificaciones del hongo (Figura 17).

3.6 Comparación de la mortandad ocasionada por los medios de inoculación en las cepas que presentaron patogenicidad

En primer lugar, se realizó la comparación de medias del IM para cada cepa que presentó efecto patogénico en *A. mellifera* según el método de inoculación, por medio de una inferencia basada en dos muestras con la Prueba de t-Student. Dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad, se recurrió a un procedimiento no paramétrico como alternativa a la Prueba de t de dos muestras. Se probó la igualdad de las medias de mortandad de los métodos de inoculación “aspersión” y “contacto” con la Prueba de dos muestras de Wilcoxon para muestras independientes ($\alpha=0,05$), como sugiere Walpole *et al.* (2012).

4. RESULTADOS de la determinación de patogenicidad de diferentes cepas de hongos entomopatógenos procedentes de viñedos del Oeste argentino sobre individuos adultos

4.1 De *Harmonia axyridis* mediante la técnica de aspersión y contacto

Con el fin de simplificar el análisis de los resultados obtenidos en *H.axyridis*, se presentan los dos métodos de inoculación en conjunto, a pesar de corresponderse a objetivos diferentes.

Ninguna de las cepas de HEs evaluadas en los métodos por Aspersión y Contacto sobre adultos de *H.axyridis* mostró acción patogénica ($\bar{x}=0$). Tampoco se observaron vaquitas muertas por HEs en el testigo.

4.2 De *Apis mellifera* mediante la técnica de aspersión

Los valores de promedio del IM y de D.E. para cada cepa obtenidos al implementar el método de inoculación por Aspersión se muestran en la Tabla 4. De los 24 aislados evaluados, ACA, ARG, BinsAR-1, BinsAR-2, MsoilAR-17.9, MsoilAR-2.3(3) y MsoilAR-2.4(2), no presentaron efecto patogénico sobre *A. mellifera*, como así tampoco el testigo ($\bar{x}=0$); por lo cual no se tuvieron en cuenta para análisis posteriores. Contrariamente, se observó que 6 de los 24 aislados evaluados causaron un índice de mortandad de 1, mientras que los valores promedio de IM obtenidos para las 11 cepas restantes fueron variables.

Tabla 4: Valores de media del IM y D.E. obtenidos por cepa mediante el método de inoculación por Aspersión.

CEPA	$\bar{X} \pm D.E$
MsoilAR-15.1	0,13 \pm 0,23
MsoilAR-10	0,2 \pm 0,35
BsoilAR-4.1(2)	0,27 \pm 0,31
PsoilAR-24.3	0,27 \pm 0,12
CCH	0,33 \pm 0,12
MsoilAR-14.3	0,4 \pm 0,2
MsoilAR-15.3	0,47 \pm 0,23
MsoilAR-16.3	0,67 \pm 0,31
MsoilAR-18.5(3)	0,67 \pm 0,42
MsoilAR-2.3(1)	0,67 \pm 0,58
PsoilAR-2.3(4)	0,67 \pm 0,58
MsoilAR-2.3(2)	1 \pm 0
MsoilAR-2.3(4)	1 \pm 0
MsoilAR-2.5(2)	1 \pm 0
MsoilAR-4.3	1 \pm 0
PsoilAR-4.1(2)	1 \pm 0

RINCO

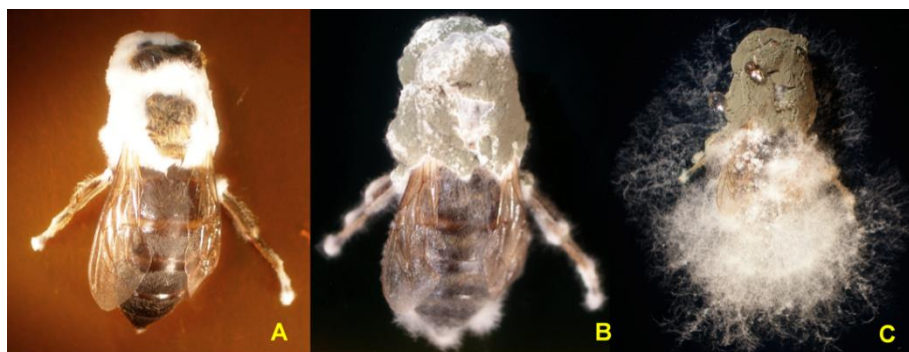
 1 ± 0 

Figura 19: Ejemplo de la evolución post mortem de la afección del hongo *M. robertsii* cepa MsoilAR-2.5 (2) sobre un individuo adulto de *A. mellifera*. (A) 72 h, (B) 120 h, y (C) 168 h. Fotos: López Plantey R.

4.3 De *Apis mellifera* mediante la técnica de contacto

Los valores de la media del IM y D.E. para cada aislado al realizar el método de inoculación por Contacto se muestran en la Tabla 5. De las 24 cepas evaluadas, MsoilAR-4.3, MsoilAR-15.1, ACA, ARG, BinsAR-1, BinsAR-2, MsoilAR-17.9, MsoilAR-2.3(3) y MsoilAR-2.4(2), no presentaron efecto patogénico sobre *A. mellifera*, como así tampoco el testigo ($\bar{x}=0$); por lo que se descartaron para análisis posteriores. Por el contrario, se observó que 5 de los aislados evaluados causaron un índice de mortalidad 1 (mortalidad total), mientras que los 10 restantes presentaron valores de media variables (Tabla 5).

Tabla 5: Valores de media del IM y D.E. obtenidos por cepa mediante el método por Contacto.

CEPA	$\bar{X} \pm D.E$
BsoilAR-4.1(2)	$0,33 \pm 0,58$
CCH	$0,33 \pm 0,23$
MsoilAR-10	$0,33 \pm 0,12$
MsoilAR-16.3	$0,33 \pm 0,58$
PsoilAR-2.3(4)	$0,33 \pm 0,31$
RINCO	$0,33 \pm 0,31$
MsoilAR-14.3	$0,47 \pm 0,42$
MsoilAR-15.3	$0,67 \pm 0,58$
MsoilAR-18.5(3)	$0,67 \pm 0,58$
PsoilAR-24.3	$0,67 \pm 0,58$
MsoilAR-2.3(1)	1 ± 0
MsoilAR-2.3(2)	1 ± 0
MsoilAR-2.3(4)	1 ± 0

MsoilAR-2.5(2)	1 ± 0
PsoilAR-4.1(2)	1 ± 0

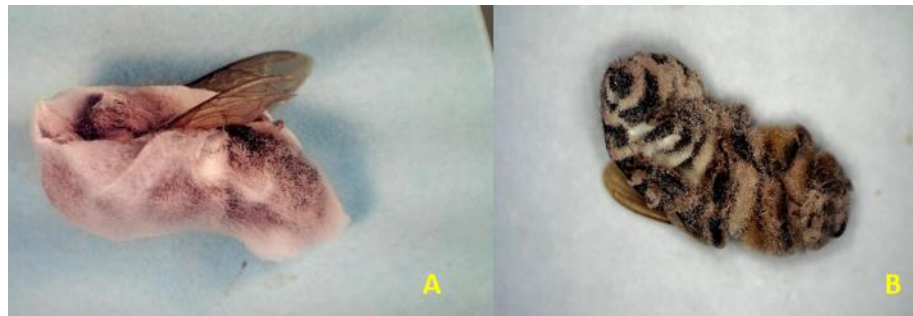


Figura 20: Adultos de *A. mellifera* infectados por el hongo *Paecilomyces lilacinus* (A) cepa PsoilAR-24.3, y (B) cepa PsoilAR-4.1(2). Fotografías propias.

4.4 De *Apis mellifera* mediante la técnica de transferencia

Ninguna de las cepas evaluadas mostro acción patogénica ($\bar{x}=0$) sobre *Apis mellifera* al probar la técnica de transferencia (no se tuvo en cuenta para el cálculo del IM al individuo infectado y marcado). Por lo tanto, estos valores no se tuvieron en cuenta en los análisis posteriores.

4.5 Comparación de la mortandad ocasionada por los medios de inoculación en las cepas que presentaron patogenicidad

Al considerar únicamente las técnicas de inoculación por “Aspersión” y “Contacto” solo para aquellas cepas que mostraron actividad patogénica en, al menos uno de los dos bioensayos, surge la Figura 21:

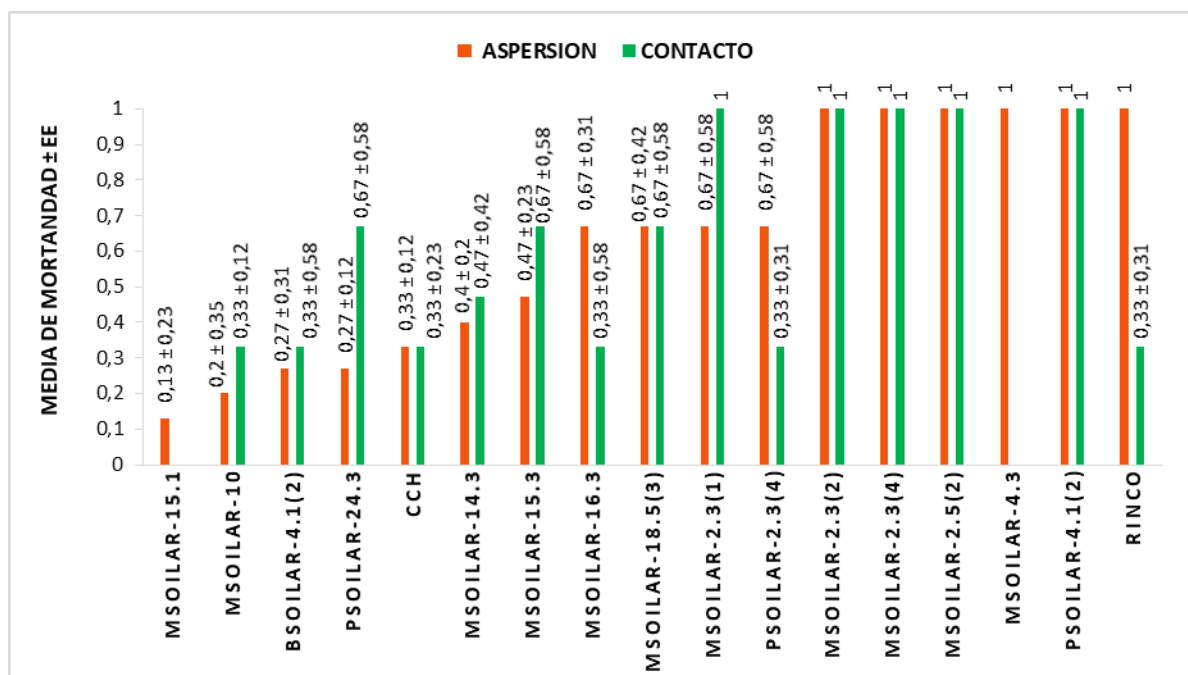


Figura 21: Valores de media de IM de las cepas que mostraron acción patogénica; es decir, porcentaje de abejas muertas por infección por HE, según los métodos de inoculación (Prueba Wilcoxon $\alpha=0,05$).

Se aceptó la Hipótesis nula de que no existe diferencia significativa en el IM entre los métodos de inoculación para un $\alpha=0,05$ ($p>0,05$) en todas las cepas evaluadas.

Tabla 6: Resultados de la Prueba Wilcoxon para los métodos de inoculación por Aspersión y por Contacto.

CEPA	Media de mortandad \pm EE						Wilcoxon p-valor
	ASPERSION			CONTACTO			
MsoilAR-15.1	0,13	\pm	0,23	0	\pm	0	>0,9999
MsoilAR-10	0,2	\pm	0,35	0,33	\pm	0,12	0,8000
BsoilAR-4.1(2)	0,27	\pm	0,31	0,33	\pm	0,58	>0,9999
PsoilAR-24.3	0,27	\pm	0,12	0,67	\pm	0,58	0,8000
CCH	0,33	\pm	0,12	0,33	\pm	0,23	>0,9999
MsoilAR-14.3	0,4	\pm	0,2	0,47	\pm	0,42	0,8000
MsoilAR-15.3	0,47	\pm	0,23	0,67	\pm	0,58	0,6000
MsoilAR-16.3	0,67	\pm	0,31	0,33	\pm	0,58	0,6000
MsoilAR-18.5(3)	0,67	\pm	0,42	0,67	\pm	0,58	>0,9999
MsoilAR-2.3(1)	0,67	\pm	0,58	1	\pm	0	>0,9999
PsoilAR-2.3(4)	0,67	\pm	0,58	0,33	\pm	0,31	0,6000
MsoilAR-2.3(2)	1	\pm	0	1	\pm	0	sd
MsoilAR-2.3(4)	1	\pm	0	1	\pm	0	sd
MsoilAR-2.5(2)	1	\pm	0	1	\pm	0	sd
MsoilAR-4.3	1	\pm	0	0	\pm	0	0,1000
PsoilAR-4.1(2)	1	\pm	0	1	\pm	0	sd
RINCO	1	\pm	0	0,33	\pm	0,31	0,1000

*EE: Error Estándar

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La interacción entre HE y organismos benéficos o “no objetivo” puede ser positiva (sinérgica), o negativa (antagonista) (Roy y Pell, 2000). Una situación ideal en el manejo de plagas se daría en el caso de establecerse una interacción benéfica entre los organismos mencionados, favoreciendo la utilización de biopesticidas por encima de los plaguicidas sintéticos.

En la presente Tesina de Grado se evaluó la patogenicidad de distintas cepas de HE procedentes de viñedos del oeste argentino, una cepa comercial argentina y dos cepas italianas. Los organismos sobre los cuales se realizaron los ensayos fueron dos especies benéficas que brindan destacados servicios al ecosistema: la “abeja europea”, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) como principal polinizador y clave para la elaboración de miel, ceras, y otros productos; y la “vaquita asiática”, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) como voraz depredador de plagas agrícolas.

En los bioensayos ejecutados con las distintas cepas de HE sobre la vaquita asiática se observó que ninguno de los tratamientos arrojó índices de mortandad positivos a concentraciones de 10^7 conidios. mL^{-1} . La falta de efecto patogénico coincide con los resultados de otros investigadores sobre el coccinélido en estudio (Roy *et al.*, 2008), en los cuales solo se manifestó efecto patogénico a dosis de 10^9 conidios. mL^{-1} . Valores de mortandad positivos se han observado sobre otras especies de coccinélidos como *Coccinella septempunctata*, *Adalia bipunctata* (Roy *et al.*, 2008) e *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) (James *et al.*, 1998); que fueron susceptibles al desarrollo de micosis en condiciones ambientales favorables y concentraciones de conidios del orden de 10^7 . mL^{-1} .

Vilcinskas *et al.* (2012) explican que la fuerte resistencia de *H. axyridis* a patógenos se debería al robusto sistema inmunitario que posee. Esta ventaja natural la posiciona como un invasor voraz que causaría impactos negativos en la economía y en el nuevo ecosistema colonizado, al desplazar especies nativas (Holgado *et al.*, 2014). El éxito invasivo de la vaquita asiática se debe a la acción de péptidos antimicrobianos presentes en la hemolinfa (Schmidtberg *et al.* 2015), siendo la harmonina ((17R, 9Z) - 1,17-diaminooctadec-9-eno) el principal compuesto químico identificado. Vilcinskas *et al.* (2012) han citado otros PAM que participan en el mecanismo de defensa, entre los que se destacan: attacinas, coleopterinas, defensinas, y lisozimas.

Ante esto, se ha demostrado que los coccinélidos pueden actuar como “vectores” de agentes de CB. Estos insectos depredan principalmente poblaciones de áfidos, pudiendo desplazarse de colonia en colonia para alimentarse, resultando el traslado en un óptimo control de la plaga que es su presa (Roy y Pell, 2000). El mismo rol de vectorización se ha observado en *A. mellifera* (Soto, 2015).

En el caso de la abeja melífera se estableció un diseño experimental en el que se añadió la técnica de inoculación por “Transferencia” además de “Aspersión” y “Contacto”, debido al comportamiento social que posee. Las interacciones que existen entre las abejas por ser insectos sociales, incrementan la susceptibilidad a sufrir enfermedades debido a un aumento en las fuentes de infección (Cantwell *et al.*, 1966). Uno de los fenómenos más estudiados en el comportamiento de las especies sociales del orden Hymenoptera es la trofalaxia, y consiste en el intercambio de alimento líquido entre individuos de una misma colonia (De Marco, 2003). Este contacto frecuente entre los organismos podría favorecer la transferencia de enfermedades (Baverstock *et al.*, 2010). Asimismo, el traslado de polen desde el ambiente y la posterior alimentación a la colonia, sería un claro ejemplo de la estrategia descrita por Poidatz *et al.* 2018, al estilo “caballo de Troya”, promoviendo la entrada de inóculo con la consecuente infección de los individuos dentro de la colmena.

Los resultados arrojados en el tratamiento por transferencia muestran ausencia de acción patogénica sobre adultos de *A. mellifera* para todas las cepas de HE analizadas, viéndose afectada únicamente la

abeja marcada a la que se le asperjó el inóculo. Dado que la trofalaxia es un comportamiento más complejo que la mera transferencia de alimentos, al incluir el acicalamiento y reconocimiento entre individuos, podría pensarse que la higienización de ellos mismos disminuye el inóculo. Otra causa podría ser el fenómeno de “fiebre social” postulado por Téllez *et al.* (2009). En consecuencia, la transferencia sería una fuente de infección sin impacto.

Respecto a la técnica de inoculación por Aspersión sobre adultos de la abeja melífera, se obtuvieron resultados que concuerdan con gran parte de la bibliografía consultada. Se ha registrado efecto patogénico de cepas de los géneros *Beauveria* y *Metharizium* tanto en *A. mellifera* (Vandenberg, 1990; Ball *et al.* 1994), como en otros himenópteros polinizadores (Goerzen, 1990) e invasores (Poidatz *et al.*, 2018). Respecto al método de infección por contacto, también se obtuvo concordancia con los resultados positivos de infección causada por *Beauveria* y *Metharizium* en himenópteros sociales rudimentarios (Poidatz *et al.* 2018). No se ha detectado bibliografía que haga referencia a autores que hayan realizado bioensayos con *Paecilomyces*.

De las tres fuentes de infección utilizadas, únicamente Aspersión y Contacto mostraron resultados positivos de IM, por lo que el método por transferencia puede ser descartado al no presentar un riesgo importante. El mismo análisis se puede hacer con las cepas de HE, de las cuales algunas no mostraron efecto sobre los insectos “no-objetivo” en todas las fuentes de inoculación, y otras cepas tuvieron una fuerte acción patogénica (y variable) sobre los adultos de la abeja melífera. Cabe aclarar que de las tres cepas comerciales de *Beauveria* evaluadas, solo las italianas mostraron efecto, y no así la cepa comercial argentina. Esto podría deberse a la baja concentración de conidios del producto nacional (10^5 UFC.g⁻¹), y a la contaminación del mismo con el micoparásito *Trichoderma spp.*; ambas determinaciones fueron realizadas en el Laboratorio de Fitopatología (FCA-UNCuyo).

La discusión a continuación se centra en analizar qué sucede con las cepas que poseen actividad patogénica sobre las plagas agrícolas y sobre los organismos benéficos, en este caso las abejas. En este sentido, es preciso mencionar los conceptos de “patogenicidad fisiológica y ecológica” desarrollados por Roy y Pell (2000). En el primer caso, se daría una interacción antagónica entre los HE y el polinizador sólo bajo condiciones ambientales óptimas para el patógeno, que pueden asimilarse a las condiciones controladas de laboratorio. El concepto de patogenicidad ecológica se refiere a la posibilidad de que el himenóptero sea infectado en las condiciones reales de campo, que probablemente son inferiores al óptimo para el HE.

Muchos son los autores que apoyan la teoría de las diferencias en las tasas de infección entre condiciones de laboratorio y en el campo, entre ellos Mommaerts *et al.* (2009). Por su parte, James *et al.* (1998) estudiaron el efecto de la temperatura y de la humedad en el desarrollo de micosis, dado que, por ejemplo, ambas influyen en la germinación de los conidios y en el crecimiento del patógeno. Es decir, los insectos pueden presentar susceptibilidades diferentes a los HE en condiciones de campo que difícilmente se pueden simular en condiciones controladas de laboratorio (Roy y Pell, 2000).

Otro factor a tener en cuenta y que remarcan algunos autores como Ball *et al.* (1994), es la escasa humedad existente en los viñedos del Oeste argentino. Esta condición ambiental evitaría el desarrollo de la enfermedad causada por HE sobre los polinizadores. A pesar de esto, se plantea una amplia discusión respecto al efecto de los biopesticidas sobre los organismos no objetivos, para lo cual se puede plantear una posibilidad de manejo de plagas con separación *temporo espacial* de los tratamientos con biopesticidas y el momento de mayor susceptibilidad de los organismos benéficos (Roy y Pell, 2000). Para el caso de la vid, deberían evitarse las aplicaciones en los períodos de floración y envero que son las épocas de mayor presencia de polinizadores himenópteros.

Debido a que todos los resultados fueron obtenidos en condiciones de laboratorio, es necesario continuar con investigaciones que evalúen el efecto de las cepas estudiadas en condiciones reales de campo.

6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ABOUHAMAD, S.; ROJAS, R., M.V.; MÉNDEZ R; J.L.; SALAZAR C., K.; SALMERÓN A., A.L. 2017. Servicios ecosistémicos de regulación que benefician a la sociedad y su relación con la restauración ecológica. *Biocenosis* • Vol. 31 (1-2): 80-92

ALCIDES, M.; CALVALCANTI R.S. 2012. Hongos y nematodos entomopatógenos. En MOREIRA, F.M.S.; HUISING, E.J.; BIGNELL, D.E. *Manual de Biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo*. Ed. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales e Instituto Nacional de Ecología, México. Capítulo 10., p 287-295.

ALEAN, I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Tesis (Microbióloga Agrícola y Veterinaria). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología Agrícola y Veterinaria, Bogotá, DC, CO. 107 p.

ARRUBLA M., P.F.; CÁRDENAS R., M.; POSADA F., F.J. 2010. Efecto de la humedad relativa sobre la germinación de las esporas de *Beauveria bassiana* y la patogenicidad a la broca del café *Hypothenemus hampei*. *Revista U.D.C.A Actual y Divulgación Científica*. Vol. 13(1): 68, p 67-76. [Fecha de consulta: 2 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n1/v13n1a08.pdf>

Apolo. Observatorio de Agentes Polinizadores. Polinizadores y biodiversidad. [Fecha de consulta: 2 de julio de 2018]. Disponible en: http://apolo.entomologica.es/cont/materiales/informe_tecnico.pdf

BAHENA J., F. 2008. *Enemigos naturales de las plagas agrícolas del maíz y otros cultivos*. Libro Técnico Núm. 5. SAGARPA - INIFAP. Uruapan, Michoacán, México, p 180.

BALL, B.V.; PYE, B.J.; CARRECK, N.L.; MOORE, D.; BATEMAN, R.P. 1994. Laboratory testing of a mycopesticide on non-target organisms: the effects of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* applied to *Apis mellifera*. *Biocontrol Science and Technology*, 4(3):289-296.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Edition, p 217.

BAVERSTOCK, J.; ROY, H.E.; PELL, J.K. 2010. Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl* 55:89–102. DOI 10.1007/s10526-009-9238-5

CANTWELL, G.E.; KNOX, D.A.; LEHNERT, T.; MICHAEL, A.S. 1966. Mortality of the honey bee, *Apis mellifera*, in colonies treated with certain biological insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*. 8(2), p 228-233.

CAÑEDO, V.; AMES, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, p 62.

CASTILLO, C.E.; CAÑIZALEZ, L.M.; VALERA, R.; GODOY, J.C.; GUEDEZ, C.; OLIVAR, R., MORILLO, S. 2012. Caracterización morfológica de *Beauveria Bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo - Venezuela. *Revista ACADEMIA Trujillo - Venezuela - ISSN 1690-3226*. Vol. 11 (23), p 275-281.

DADANT, C.C. 1975. *La colmena y la abeja melífera*. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo. Uruguay.

DE MARCO, R. 2003. Obtención de néctar, trofalaxia, y comunicación en *Apis mellifera*.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 138 p.

FISHBEIN, D. 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas. Eds. Villacide, J. y Corley, J. *Serie técnica: "Manejo Integrado de Plagas Forestales"*. Laboratorio de Ecología de Insectos, EEA INTA Bariloche. Bariloche, Argentina. Cuadernillo (15), p 1-21.

FRANCE, A.; CISTERNAS, E.; URTUBIA, I. 2016. Hongos entomopatógenos. Microorganismos benéficos para el control de *A. nodipennis*. Valparaíso, Chile. INIA La Cruz, p 34. Disponible en: <http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2016/10/Bolet%C3%ADn34-A%C3%B1o-2016-ultimo-Hongos-entomopat%C3%B3genos.-Microorganismos-ben%C3%A9ficos-para-el-control-de-A.-nodipennis.pdf>

FRANCO C., K.G.; RODRÍGUEZ N., S.; CERVANTES M., J.F.; BARRANCO F., J.E. 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *SOCIEDADES RURALES, PRODUCCIÓN Y MEDIO AMBIENTE*. Vol. 11(22): p 143-155.

GARCÍA, M.A.; CAPPELLO G., S.; LESHER G.; J.M.; MOLINA M., R.F. 2011. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Revista Horizonte Sanitario*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Vol. 10(2): p 20-28. [Fecha de consulta: 2 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457845138002>

GARCÍA, M.; RÍOS O., L.A.; ÁLVAREZ DEL CASTILLO, J. 2016. La polinización en los sistemas de producción agrícola: revisión sistemática de la literatura. *Revista Idesia* (Arica). Vol.34 (3). [Fecha de consulta: 31 de agosto de 2018]. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292016000300008

GARRIDO, S.; CHICHÓN, L.; FERNÁNDEZ, D. (2007). Control Biológico de *Carpocapsa*. *Revista Fruticultura y Diversificación*. N°54: p 26-33. [Fecha de consulta: 10 de junio de 2018]. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-fyd54_cbiol.pdf

GOERZEN, D.W.; ERLANSON, M.A.; MOORE, K.C. 1990. Effect of two insect viruses and two entomopathogenic fungi on larval and pupal development in the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata* (Fab.) (Hymenoptera: Megachilidae). *The Canadian Entomologist*, Septiembre/Octubre, pp. 1039-1040.

GONZÁLEZ, G. 2014. Coccinellidae. En: Roig-Juñent, S., Claps, L.E. y Morrone, J.J. Biodiversidad de artrópodos argentinos. Ed. Instituto Superior de Entomología "Dr. Abraham Willink" de la Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. Volumen 3: 509-530. .

GUTIÉRREZ, R.A.; ROBLES B., A.; SANTILLÁN O., C.; ORTIZ C. M.; CAMBERO C., O.J. 2013. Control Biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el Estado de Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias*. ISSN: 2007-3380. Vol. 2(3): p 102-112.

HOLGADO, M.; LÓPEZ PLANTEY, R.; QUIROGA, V.; RABINOVICH, D.; MOLINA, M. 2014. Impacto que ocasiona la presencia de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) sobre otras especies de coccinélidos en duraznero, Mendoza, Argentina. En libro de resúmenes: XXXVII Congreso Argentino de Horticultura, Mendoza, 23 al 26 de septiembre 2014.

HUMBER, R.A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. 2005. USDA-ARS Plant Protection Research Unit. US Plant, Soil & Nutrition Laboratory. Tower Road Ithaca, NY 14853-2901, p 22-28.

HUMBER, R.A. 2005. Entomopathogenic fungal identification. Disponible en USDA, <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80620520/apswkshoprev.pdf> (visto el 22 de Junio de 2015).

HUMBER, R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. En: Lacey, L.A. (Ed.) *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 2da edición, Academic Press (Elsevier) Londres, pp. 151-186.

IANNACONE, J; PERLA, D. 2011. Invasión del depredador *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) y una evaluación del riesgo ambiental en Perú. *The Biologist* (Lima). Vol. 9 (2), p 213-233.

- JAMES, R.R.; CROFT, B.A.; SHAFFER, B.T.; LIGHTHART, B. 1998. Impact of temperature and humidity on host-pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a Coccinellid. *Biological control* 27(6):1506-1513.
- KOBASHI, Y. 1977. Miscellaneous notes on the genus *Cordyceps* and its allies. *Journal Japan Botany*. Nº52, p 269-272.
- LECUONA R.E. 1996. Microorganismos Patógenos empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Ed. INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina, p 338.
- MARTIN LÓPEZ, B.; GONZÁLEZ, J.A.; DÍAZ, S.; CASTRO, I.; GARCÍA LLORENTE, M. 2007. Biodiversidad y bienestar humano: el papel de la diversidad funcional. *Ecosistemas* 16(3): p 69-80.
- MENA C, S.V. 2010. *Evaluación de hongos entomopatógenos como potencial biocontrolador de la hormiga arriera Atta colombica (G.) del Municipio de Lloró-Chocó*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá, Colombia, p 88.
- MOMMAERTS, V.; STERK, G.; HOFFMANN, L.; SMAGGHE, G. 2009. A laboratory evaluation to determine the compatibility of microbiological control agents with the pollinator *Bombus terrestris*. *Pest Manag. Sci.* <http://doi.org/10.1002/ps.1778>
- MONZON, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. *Manejo Integrado de Plagas*. Universidad Nacional Agraria de Nicaragua. Costa Rica. Nº 63, p 95-103. [Fecha de consulta: 28 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.sidalc.net/repdoc/A2107e/A2107e.pdf>
- MOTTA D., P. A.; MURCIA O., B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente y Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*. 6 (2): p 78-84.
- NICHOLLS, C. 2008. *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Ciencia y Tecnología. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 278 p.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2014. Principios y avances sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y El Caribe. Primera Edición. Santiago de Chile, Chile. 55 p. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-i3547s.pdf>
- PAREDES, D.; CAMPOS, M.; CAYUELA, L. 2013. El control biológico de plagas de artrópodos por conservación: técnicas y estado del arte. *Ecosistemas* 22(1):56-61 p.
- PIZZUOLO, P.H.; SPERANZA, S.; PUCCI, C. 2002. Evaluación de la virulencia de dos cepas autóctonas y una comercial del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Revista PHYTOMA Poster Técnico en 13° Symposium Internacional sobre Control de plagas y enfermedades: agentes microbianos y entomófagos*. España. Nº 144: 184-186 p.
- POIDATZ, J.; LÓPEZ PLANTEY, R.; THIÉRY, D. 2018. Indigenous strains of *Beauveria* and *Metarhizium* as potential biological control agents against the invasive hornet *Vespa velutina*. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol 153. 180-185 [Fecha de consulta: 10 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.021>
- PUCHETA, M.; FLORES, A.; RODRÍGUEZ, S.; DE LA TORRE, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 31 (12), p. 856-860. [Fecha de consulta: 25 de junio de 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/339/33901204.pdf>

- QUERO, A. 2004. Las abejas y la apicultura. Ref. 1835.123. Vicerrectorado de Extension Universitaria, Universidad de Oviedo. 124 p.
- REHNER, S.A. 2005. Phylogenetics of the Insect Pathogenic Genus *Beauveria*. En: *Insect-Fungal Associations Ecology and Evolution*, Vega, F.E. y Blackwell, M. (Eds.), University Press, Oxford, pp. 3-27.
- RÍOS M., A.E. 2017. *Evaluación de riesgos ecotoxicológicos derivados del empleo del hongo entomopatógeno *Metarhizium spp.* para el control de plagas*. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes, Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España. 70 p.
- RIVERA, N.E. 2015. Abundancia y diversidad de Coccinélidos (Coleoptera: Coccinellidae) presentes en primavera en coberturas del paisaje agrícola de la zona Sur-Poniente de la Región Metropolitana: relación con la abundancia de la especie de Coccinellidae invasor, *Harmonia axyridis*. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile. 34 p.
- ROSAS. 2016. Evaluación biofísica de funciones ecosistémicas en la Cuenca del río Tunuyán Superior, Mendoza. Tesis. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza, Argentina. 74 p.
- ROY, H.E. y PELL, J.K. 2000. Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: implications for Biological Control. *Biocontrol Science and Technology* <http://doi.org/10.1080/09583150020011708>
- ROY, H.E.; BROWN, P.M.J.; ROTHERY, P.; WARE, R. L.; MAJERUS, M.E.N. 2008. Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three of coccinellid: *Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*. *BioControl* <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9122-0>
- SAINI, E.D. 2004. Presencia de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) en la provincia de Buenos Aires. Aspectos biológicos y morfológicos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 33 (1): 151-160 p. [Fecha de consulta: 21 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86433110>
- SCHAPOVALOFF, M.E. 2012. *Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate *Ilex paraguariensis* en la provincia de Misiones*. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina. 157 p.
- SCHMIDTBER, H.; RÖHRICH, C.; VOGEL, H.; VILCINSKAS, A. 2013. A switch from constitutive chemical defence to inducible innate immune responses in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Biol Lett* 9: 20130006. [Fecha de consulta: 12 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2013.0006>.
- SOTO F., M.A. 2015. *Control biológico de *Homoeosoma electellum* (Hulst) (Lepidoptera: Pyralidae) sobre girasol utilizando *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) como vector de entomopatógenos*. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara, Cuba. 40-44 pp.
- TÉLLEZ J., A.; CRUZ, R. M. G.; FLORES, M. Y.; ASAFF, T. A.; ARANA-CUENCA, A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*. Vol 30, p. 73-80. [Fecha de consulta: 25 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v30/v30a7.pdf>

TORRES DE LA C, M.; CORTEZ M., H.; ORTIZ G., C.F.; CAPPELLO G., S.; DE LA CRUZ P., A. 2013. Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología* 39 (1): p 40-46. [Fecha de consulta: 28 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v39n1/v39n1a07.pdf>

VANDENBERG, J. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(3):755-759.

VAN DRIESCHE, R.G.; HODDLE, M.S.; CENTER, T.D.; RUÍZ C.E.; CORONADA, B.J.; MANUEL, A.J. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Ed. The Forest Health Technology Enterprise Team (FHTET). Washington. 751 p.

VARGAS, M.; UBILLO, F. 2001. Toxicidad de pesticidas sobre enemigos naturales de plagas agrícolas. *Agricultura Técnica*, 61(1), 35-41. [Fecha de consulta: 20 de abril de 2018]. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0365-28072001000100004&lng=es&nrm=iso

VILCINSKAS, A.; MUKHERJEE, K.; VOGEL, H. 2012. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proc R Soc B* 280: 20122113. [Fecha de consulta: 20 de abril de 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.2113>

WALPOLE, R.E.; MYERS, R.H.; MYERS S.L.; YE, K. 2012. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. Novena edición. PEARSON EDUCACIÓN, México. ISBN: 978-607-32-1417-9. 816 p.