

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO**



**HONGOS ENTOMOPHTHORALES PATÓGENOS DE PULGONES PLAGA DE  
CULTIVOS DE CEREALES Y HORTÍCOLAS DE LA REGIÓN PAMPEANA DE LA  
ARGENTINA. ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LA DIVERSIDAD Y  
PREVALENCIA.**

**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES.**

**TESISTA: LIC. ROMINA GUADALUPE MANFRINO.**

**DIRECTORES: DRA. CLAUDIA CRISTINA LÓPEZ LASTRA y PhD. CÉSAR EDUARDO SALTO.**

**LA PLATA, 2014.**

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mi Mamá por enseñarme a valorar las cosas importantes de la vida y por ser el mejor ejemplo de mamá y de mujer; y a Raúl, por el apoyo incondicional, por quererme y brindarme todo como a una hija. A mis hermanas, Pao y Ceci por sostenernos entre las tres y aprender juntas a sortear los obstáculos; a mis hermosos sobrinos, Aylén y Alejo por la alegría y la dulzura que nos brindan; y a mis abuelas Edda y Haydeé por esperarme siempre.

A mis directores, Dra. Claudia López Lastra y PhD. César Salto, por sus innumerables aportes, y también por el vínculo de amistad que nació con ambos, gracias Clau por las oportunidades brindadas, por permitirme crecer en esta especialidad y por la comprensión, sobre todo cuando surgieron inconvenientes. Gracias César por cada uno de los viajes compartidos y por ser el principal promovedor de mi inclinación hacia la investigación científica.

Al Dr. Juan José García, por la humildad inmensa que transmite y por su ayuda incondicional;

A Susana Padín, por los momentos compartidos en el trabajo del proyecto de extensión; y a Andrea Toledo por su colaboración. A Moni por su cariño y amistad.

A cada uno de los productores de Santa Fe que me permitieron realizar los estudios en sus campos particulares, especialmente a Oscar Priore y a Félix Ahielo.

A mis amigos, los de Sarmiento por la amistad que se mantiene a pesar de las distancias y del tiempo; a los de INTA Rafaela por los inolvidables mil momentos compartidos y a los de La Plata, por ser mi sostén y compañía durante los años que me tocó estar lejos de mis vínculos más cercanos. Muy especialmente a Leti por tanto que hemos vivido juntas, a Alejandra, Julieta, Evangelina, Marianel, Mariana y Manuel por cada día compartido en el Cepave; a Eugenia y a la hermosa casualidad que hizo que compartiéramos parte de nuestros doctorados.

Agradecer a las Familia Bainotti/Sisti, por hacerme sentir parte de su familia, por la amistad y por la contención durante mi estadía en La Plata. Y a la Familia Arnaudo/Cherry por ser mi familia del corazón y estar siempre presentes.

Agradecer además a las instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo: Inta Rafaela, Agencia de Extensión Rural de Monte Vera, y Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores de La Plata y el personal asociado a cada una de ellas.

Especialmente a Julieta Merke, Natalia Bulacio, Emanuel Orellano, Agostina Giacobino y a Silvia Luiselli por cada uno de los días compartidos en Inta Rafaela, a Marcelo Signorini por sus contribuciones y asesoramiento en los análisis estadísticos, a Ruth Strasser por los viajes compartidos; a Mariano Gatti, Ariel Belavi y Matías Vigil de la Agencia de Extensión por estar siempre predispuestos para acompañarme en los viajes al campo y por hacerme sentir parte de la Agencia. A Luis Giambelluca por la asistencia en las fotos durante todo el trabajo de tesis y a María Cristina Estivariz por las ilustraciones científicas.

Por otro lado, a las Instituciones del Extranjero que participaron en la realización de este trabajo de tesis: Small Grain Institute (Sudáfrica), Julius Khun Institut (Alemania) y Universidad de Copenhagen (Dinamarca), a los investigadores Justin Hatting, Andreas Leclerque, Annette Jensen, Jorgen Eilenberg y a las lindas personas que conocí en sus países cuando los visité.

Especialmente a Justin Hatting por hacerme parte de su familia en Sudáfrica, a Anna Pía Ruoppo por los hermosos días compartidos en Alemania y a Louis por su ayuda desinteresada en el laboratorio de Dinamarca. También a Richard Humber y Donald Steinkraus por la colaboración desde Estados Unidos.

Agradecer además al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar mi estudio de posgrado mediante el otorgamiento de las becas y a la Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo por la formación recibida. Por otro lado, agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación del viaje a Alemania que me permitió capacitarme y entrenarme con técnicas específicas.

*A mi familia, especialmente a mi papá*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>7</b>
<i>Manejo de los insectos plaga en sistemas de cultivos: los áfidos como problema</i> .....	<i>8</i>
<i>Ciclo de vida de los pulgones</i> .....	<i>9</i>
<i>Control químico</i> .....	<i>11</i>
<i>Manejo integrado de Plagas</i> .....	<i>12</i>
<i>Hongos Entomopatógenos</i> .....	<i>13</i>
<i>Potencial de los Hongos Entomophthorales como agentes de control de áfidos</i> .....	<i>13</i>
<i>Biología y Ecología de los Hongos Entomophthorales</i> .....	<i>14</i>
<i>El ciclo de vida de los hongos Entomophthorales</i> .....	<i>17</i>
<i>Prevalencia de las infecciones fúngicas</i> .....	<i>19</i>
<i>Factores que influyen en la transmisión de hongos patógenos</i> .....	<i>20</i>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>24</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES</b> .....	<b>30</b>
<i>Descripción del área de estudio</i> .....	<i>30</i>
<i>Características del área de estudio</i> .....	<i>30</i>
<i>Muestreo de insectos</i> .....	<i>31</i>
<i>Identificación y determinación de la abundancia de las especies</i> .....	<i>32</i>
<i>Análisis estadísticos</i> .....	<i>32</i>
<i>Datos ambientales</i> .....	<i>33</i>
<b>CAPÍTULO I: Identificación y Aislamiento de Hongos Entomophthorales</b> .....	<b>34</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
<i>Identificación de los hongos Entomophthorales mediante caracteres morfológicos:</i> .....	<i>40</i>
<i>Identificación de los hongos Entomophthorales mediante técnicas moleculares:</i> .....	<i>41</i>
<i>Aislamiento de Hongos Entomophthorales</i> .....	<i>43</i>

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<i>Identificación por métodos de taxonomía clásica .....</i>	<i>44</i>
<i>Identificación por técnicas moleculares.....</i>	<i>50</i>
<i>Aislamiento de hongos entomophthorales .....</i>	<i>54</i>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO II: Hongos Entomophthorales patógenos de áfidos en Cereales .....</b>	<b>58</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>	<b>59</b>
<i>Características de las especies de pulgones plagas de cereales .....</i>	<i>61</i>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>68</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>68</b>
<i>Muestreo de áfidos .....</i>	<i>70</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<i>Identificación de hongos patógenos de áfidos.....</i>	<i>71</i>
<i>Prevalencia y Estacionalidad .....</i>	<i>76</i>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>84</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>86</b>
<b>CAPÍTULO III: Hongos Entomophthorales patógenos de áfidos en Hortícolas .....</b>	<b>87</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>88</b>
<i>Caracterización regional .....</i>	<i>88</i>
<i>Limitantes productivas por artrópodos plaga.....</i>	<i>90</i>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>92</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS: .....</b>	<b>92</b>
<i>Estudio a campo .....</i>	<i>92</i>
<i>Muestreo de áfidos .....</i>	<i>92</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>96</b>
<i>Variaciones poblacionales de áfidos sanos e infectados. ....</i>	<i>98</i>
<i>Relación entre el porcentaje de infección y la densidad de la población hospedadora .....</i>	<i>104</i>
<i>Relación entre las infecciones fúngicas y los estados de desarrollo del hospedador.....</i>	<i>106</i>
<i>Relación del número de áfidos infectados con la temperatura y la humedad relativa .....</i>	<i>110</i>
<i>Presencia de otros enemigos naturales .....</i>	<i>112</i>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>114</b>

<b>CAPÍTULO IV: Potencial de los Hongos Entomophthorales en estrategias de Control Biológico Conservativo .....</b>	<b>118</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>119</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>121</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>121</b>
<i>Estudio a campo .....</i>	<i>121</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>122</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>128</b>
<i>Plantas hospedadores y sus áfidos asociados .....</i>	<i>128</i>
<i>Márgenes de cultivos como refugios para hongos entomophthorales. ....</i>	<i>129</i>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>131</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>134</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>139</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>141</b>
<b>REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS .....</b>	<b>143</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>164</b>
<i>Medios de cultivo .....</i>	<i>164</i>
<i>Colorantes .....</i>	<i>164</i>
<i>Antibióticos.....</i>	<i>164</i>
<i>Datos metereológicos .....</i>	<i>164</i>



**RESUMEN Y ABSTRACT**

## RESUMEN

Los cultivos agrícolas se ven expuestos a adversidades de diferentes orígenes, ya sean bióticos o abióticos. En los sistemas extensivos e intensivos de la Región Pampeana Argentina (centro norte) los áfidos representan una importante limitante ya sea en cultivos de cereales u hortícolas. El manejo de las poblaciones de estos insectos se realiza principalmente mediante el uso de insecticidas de síntesis orientando las acciones hacia la eliminación del insecto blanco que se intenta controlar. Se considera al cultivo aislado del ecosistema y por lo tanto del resto de los elementos que lo conforman.

El manejo integrado de plagas (MIP) se presenta como una alternativa viable que posibilita la obtención de altos rendimientos compatibles con la sustentabilidad del sistema. Dentro del MIP una estrategia difundida con mayor énfasis en los últimos años, es el Control Biológico mediante la utilización de hongos entomopatógenos. En este grupo de agentes de control biológico, los Hongos Entomophthorales son importantes antagonistas de áfidos en condiciones de campo y presentan un alto potencial para su utilización en estrategias de Control Biológico Conservativo (CBC). Sin embargo, un profundo conocimiento de la biología y ecología de estos organismos es necesario para respaldar la toma de decisiones que permitan potenciar su uso en estrategias de MIP.

Los objetivos de este trabajo de tesis se basaron fundamentalmente en la identificación y caracterización de los hongos entomophthorales como factores de mortalidad de los áfidos, en la determinación de los niveles de infección en cada cultivo y en el estudio de los factores que favorecen o inhiben su actividad en condiciones de campo. Además, se consideró el estudio de la vegetación de crecimiento espontáneo presente en los bordes de los cultivos para su posible inclusión en estrategias de CBC de áfidos en agroecosistemas de la región pampeana argentina.

Se registraron cuatro especies de hongos Entomophthorales entomopatógenos, infectando áfidos en cultivos de cereales, hortícolas y en la vegetación aledaña a los cultivos. Las identificaciones fueron realizadas por métodos de taxonomía clásica y molecular. La especie más prevalente fue *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber, seguido por *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko, *Entomophthora planchoniana* Cornu y *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Remaudière & Keller

(Neozygitales: Neozygitaceae). Se registraron prevalencias de *E. planchoniana* y de *P. neoaphidis* de hasta el 98.1 (n=3212) y 90.2 % (n=278) en cultivos de pimiento y de trigo respectivamente; mientras que infecciones causadas por *Z. radicans* alcanzaron el 63.7% (n=270) en áfidos en cultivo de trigo. Asimismo se registraron hongos patógenos de áfidos en la vegetación no cultivada presente en los bordes de los cultivos. *Pandora neoaphidis* fue la especie prevalente alcanzando un nivel de infección de 73.9% (n=88) en *Hypermyzus carduellinus* (Theobald) sobre la planta sustrato *Sonchus oleraceus* (L).

En relación a los factores bióticos o abióticos que influyen el desarrollo de las micosis en estos insectos, se logró determinar que en algunos casos la densidad de la población hospedadora fue un factor determinante para el desarrollo de epizootias, mientras que en otros no hubo asociación entre estas variables. Se observaron diferencias en las infecciones entre los estados de desarrollo de los áfidos, siendo mayor el riesgo de infección de ninfas en comparación con el riesgo de infección de adultos ápteros y de adultos alados. Asimismo se detectó la presencia de parasitoides y depredadores en simultáneo con la ocurrencia de infecciones fúngicas sin haber sido registradas infecciones en estos enemigos naturales. Por otro lado, infecciones fúngicas se desarrollaron aún con aplicaciones de agroquímicos, lo que permite suponer que los activos de síntesis no inhibieron por completo la transmisión de los hongos entomopatógenos.

En cuanto a la estacionalidad, se observaron infecciones fúngicas en todas las estaciones del año, siendo más predominantes en otoño-invierno. Las temperaturas relativamente bajas y los porcentajes de humedad altos propiciaron la transmisión de los hongos patógenos a los insectos “blanco” sanos. Importantes epizootias de *P. neoaphidis* y de *E. planchoniana* fueron registradas en cultivos de pimiento, berenjena, trigo y en plantas de crecimiento espontáneo presente en los bordes de los cultivos. En algunos cultivos, en determinados momentos, las infecciones fúngicas lograron reducir las poblaciones de áfidos por debajo del umbral de daño económico.

La ocurrencia y los niveles de infección fúngica de hongos entomofthorales permiten inferir que podrían ser utilizados en programas de MIP. La predicción de los momentos en que se presentan podría constituir una herramienta útil en la toma de decisiones en programas de manejo sustentable de las poblaciones de áfidos lo cual contribuiría a establecer buenas prácticas agrícolas que tiendan a la sustentabilidad de

los sistemas productivos, permitiendo la protección y la integridad de los recursos naturales, siendo rentables para el productor para contribuir al crecimiento económico y el bienestar de la sociedad.

**ABSTRACT**

Agricultural crops are exposed to biotic and abiotic adversities. In extensive and intensive crop systems of the Argentinian Pampas (North central region). Aphids are a major limiting factor on cereal and on horticultural crops. The control of these insects populations is mainly made through the use of synthetic insecticides, directing the actions towards eliminating the target insect that attempts to control. The crop is considered isolated from surrounding ecosystem and therefore from the others elements which help in keeping the natural control of the fitofagous insects.

The Integrated Pest Management (IPM) is a viable option which enables to obtaine high yields compatible with the sustainability of the system. In recent years, the biological control through entomopathogenic fungi is a strategy with more emphasis. Among entomopathogenic fungi, the Order Entomophthorales is an important mortality factors of aphids in the field and has a high potential in order to be considered for using in Consercative Biological Control (CBC) strategies for aphids control. However, a thorough understanding of the biology and ecology of these organisms is necessary to support decision-making for enhancing their use in IPM strategies.

The goals of this thesis were to identify and to characterize the entomophthoralean fungi as mortality factors of aphids; to determine the infection levels on each crop and to study of the conditions that enhance or inhibit their activity on the field. Furthermore, it was considered the study of the non-crop vegetation in borders around crops to possible inclusion in CBC strategies on agro-ecosystems of the Pampeana region.

Four species of Entomophthoralean fungi were recorded infecting aphids on cereal and on horticultural crops, as well as on natural vegetation adjacent to crops. The fungal species were identified by methods of classical and molecular taxonomy. The most prevalent specie recorded from aphids was *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber, followed by *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko, *Entomophthora planchoniana* Cornu, *Zoophthora* sp. and *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Remaudière & Keller (Neozygiales: Neozygitaceae). Infection levels of *E. planchoniana* and of *P. neoaphidis* reached up 98.1 (n=3212) and 90.2 % (n=278) on pepper and wheat crops, respectively, while that infections of *Z. radicans* reached 63.7% (n=270) on pest aphids

of wheat. Likewise, pathogenic fungus of aphids were recorded from aphids on non-crop vegetation that grows around the crops. *Pandora neoaphidis* was the most prevalent specie reaching an infection level of 73.9% (n=88) on *Hypermyzus carduellinus* (Theobald) in *Sonchus oleraceus* (L.).

In relation to biotic or abiotic factors that influence the development of fungal infections, it was determined that, in some cases, the host population density was a key factor to enhance epizootics development; while in other cases there was not an association among this variables. Differences in the number of infected aphids were found between developmental stages. The likelihood of nymphs becoming infected was greater than the likelihood that apterae or alatae would become infected. Also, there were recorded parasitoids and predators simultaneously with the occurrence of fungal infections, and no fungal infections were recorded for these natural enemies. Furthermore, fungal infections were developed even with agrochemical applications, allowing us to assume that the chemicals not completely inhibited the transmission of entomopathogenic fungi.

With regard to seasonality, fungal infections were observed in all the seasons, but they were most common in autumn and winter. Relatively low temperatures and high humidity percentages propitiated the transmission of pathogenic fungi. Interestingly, high levels of infection were detected during the summer months with high temperatures and dry conditions. Significant epizootics of *P. neoaphidis* and *E. planchoniana* were recorded in pepper, eggplant and wheat crops; as well as in non-crop vegetation that growth at the edges of the crops. In some crops, at certain times fungal infections were able to reduce aphid populations below the economic threshold.

The occurrence and infections levels of Entomophthorales fungi determined their possible used in IPM programs. The prediction of the moments that fungal infections occur, could be a useful tool in making decisions on sustainable management programs of aphid populations and contribute to good agricultural practices tending to the sustainability of production systems, enabling the protection and integrity of natural resources, being profitable for the farmers and acceptable since it could to contribute to economic growth and welfare of the society.



**INTRODUCCIÓN Y MATERIALES Y MÉTODOS  
GENERALES**

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Según las predicciones de la Organización de Naciones Unidas (ONU), para el año 2030 la población mundial necesitará por lo menos un 35% más de alimentos, un 40% más de agua y un 50% más de energía. Es así que la integración entre el desarrollo económico y la protección al medio ambiente, conocido como desarrollo sostenible es uno de los grandes desafíos globales de la actualidad. La orientación agrícola-ganadera de la economía Argentina obliga a repensar la agricultura dentro de un nuevo modelo que englobe a la actividad dentro de un paradigma sustentable. La obtención de beneficios económicos debe ser compatible con la sustentabilidad de los recursos naturales.

Esto implica la adopción de cambios en las formas de producción. En la agricultura actual la tendencia es la simplificación de los ambientes al máximo, considerando al cultivo como el principal elemento del sistema, aislado de su contexto, y eliminando todo lo que amenace la obtención de altos rendimientos del cultivo de que se trate (Altieri, 1992).

El resultado final es la producción de un ecosistema artificial y homogéneo que requiere de una constante intervención humana. Entre las principales consecuencias de este modelo de agricultura se mencionan: disminución de la eficiencia energética dado que cada vez se necesita mayor cantidad de energía para producir aumentos de rendimientos; dependencia creciente de agroquímicos y en mayores dosis, lo que genera contaminación de suelos y aguas; disminución de la capacidad productiva de los suelos, en parte, por el uso de una inadecuada tecnología no asociada a la capacidad de uso de los mismos, que se traduce en pérdidas por erosión. Asimismo no debe dejar de contemplarse la pérdida de calidad de los acuíferos debido a la salinización y a la contaminación que son causadas en muchos casos, por el exceso de residuos de agroquímicos (adaptado de Sarandón, 2003). Estas características hacen a este sistema de producción inestable y extremadamente costoso (Altieri, 1992).

Cómo paliativo a estas consecuencias derivadas de la mala explotación de los recursos, deben ser adoptadas prácticas que tiendan a la sustentabilidad de los sistemas productivos. Son considerados sistemas sustentables aquellos que permiten proteger la

integridad de los recursos naturales, ser rentables para el productor y ser socialmente aceptables para contribuir al crecimiento económico y el bienestar de la sociedad. La sustentabilidad no es un estado permanente, sino que representa una trayectoria más o menos sostenible dentro del proceso productivo donde cada empresa deberá asumir el compromiso de mantener la calidad de los recursos utilizados para asegurar producciones futuras (Spedding, 1995; Satorre, 2004). En el contexto actual, las tecnologías de procesos se han convertido en una necesidad para mantener la sustentabilidad de los diferentes sistemas productivos que se desarrollan en vastas zonas del país, concebidas desde una óptica sistémica que tenga en cuenta las interrelaciones y valore el conocimiento científico.

Entre las buenas prácticas agronómicas que favorecen la conservación de los recursos naturales se mencionan, la siembra directa, la labranza reducida, la rotación de cultivos anuales con pasturas perennes, la elección de especies o variedades resistentes a determinadas plagas, el control mecánico y biológico de malezas, y enfermedades, la correcta elección de las épocas de siembra y cosecha, el uso de plaguicidas de baja toxicidad y persistencia y el mantenimiento de sitios con vegetación natural que favorezcan la presencia de enemigos naturales y fomenten de esta manera el control biológico de las plagas enmarcado en estrategias de manejo integrado de plagas.

#### *Manejo de los insectos plaga en sistemas de cultivos: los áfidos como problema*

Entre las principales plagas en cultivos agrícolas se mencionan como más importantes los insectos pertenecientes a los órdenes: Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Orthoptera, entre otros. Los pulgones o áfidos (Familia Aphididae), debido a sus características biológicas e impacto económico en los cultivos, representan uno de los grupos entomológicos más importantes desde el punto de vista agronómico, y algunos de ellos se transforman en serias plagas de las plantas cultivadas (Delfino, 2005). Pertenecen al Orden Hemiptera, Suborden Sternorrhyncha, Familia Aphididae, Subfamilia Aphidinae.

Los hemípteros, en general, poseen un aparato bucal picador chupador en el cual las piezas bucales están modificadas formando una estructura en forma de pico denominada rostro y adaptado para perforar y succionar líquidos de plantas

(como savia) y animales (por ejemplo, sangre). En el rostro, las mandíbulas y las maxilas tienen forma de aguja y están envueltas por el labio; todo el conjunto está normalmente plegado en la parte ventral del cuerpo cuando no se utiliza. Los áfidos son fitófagos, los finos y largos estiletes del aparato bucal les sirven para introducirlos en los tejidos de las plantas llegando hasta el floema. Los daños producidos suelen ser el resultado directo de su alimentación. Provocan el amarilleamiento, arrosamiento, deformaciones y caída anticipada de las hojas, además de la disminución del crecimiento y el ennegrecimiento de los órganos de las plantas debido al desarrollo de hongos saprofitos (conocidos como fumaginas) sobre el melado excretado por los áfidos. Los mencionados síntomas son una consecuencia de la abundante extracción de savia y de una particular reacción de la planta hospedante a la inyección de saliva generalmente tóxica (Delfino y Binazzi, 2002). Además de los daños directos que causan en los cultivos cuando aumentan sus poblaciones, también transmiten virus fitopatógenos que provocan disminución en los rendimientos y calidad de las semillas (Blackman & Eastop, 2000). De las aproximadamente 4000 especies de pulgones descritas, 192 transmiten 275 virosis, seguidas en orden descendente por Aleyrodidae (43 virosis), Cicadellidae (31) y Chrysomelidae (30) (Nault 1997).

El éxito biológico de los áfidos está sintetizado por Carver (1991): “los áfidos han tenido éxito debido a su alta fecundidad. Las características de partenogénesis, viviparidad y polimorfismo, conjuntamente, han hecho posible el telescopamiento de generaciones y consecuentemente una tasa de reproducción muy alta, y una división del trabajo entre formas ápteras, concentradas en la reproducción, y formas aladas dedicadas a la dispersión. Por otra parte, ha contribuido al éxito el desarrollo de los ciclos de vida complejos y de plantas hospedadoras especializadas. Las excepciones y las variaciones son comunes, pero la sexualidad normal, es decir con anfigonia y la oviparidad están restringidas a una única generación anual”.

#### Ciclo de vida de los pulgones

El ciclo biológico de estos insectos suele ser complejo e involucra la alternancia de una fase de reproducción sexual y una partenogenética. En general, los áfidos toleran las condiciones adversas del invierno atravesando este período como huevos, en estado de latencia. Cerca del inicio de la primavera eclosionan las ninfas y de cada una surge

una hembra áptera llamada *fundatrix*. Esta forma está más adaptada para reproducirse en forma masiva y acelerada por partenogénesis. De la hembra fundatrix surgen nuevas hembras partenogénéticas que se reproducen por dos o tres generaciones, hasta que surgen las hembras *virginóparas*. Estas hembras aladas emigran a un hospedero secundario y originan nuevas hembras partenogénéticas llamadas *exiliadas*. De estas hembras exiliadas, que se reproducen por partenogénesis durante los meses de verano, surgen los machos alados y hembras *ginóparas*, también aladas. A finales del otoño, los machos y las hembras ginóparas emprenden el vuelo de retorno al hospedero primario. En el, las hembras ginóparas originan hembras *ovíparas* (hembras sexuales) que se aparean con los machos y realizan una nueva puesta de huevos (Fig. i). Durante el ciclo, se realiza una única puesta de huevos y las demás generaciones se originan a partir de hembras partenogénéticas que son vivíparas, las cuales atraviesan cuatro estadios ninfales antes de alcanzar su forma adulta y poder reproducirse.

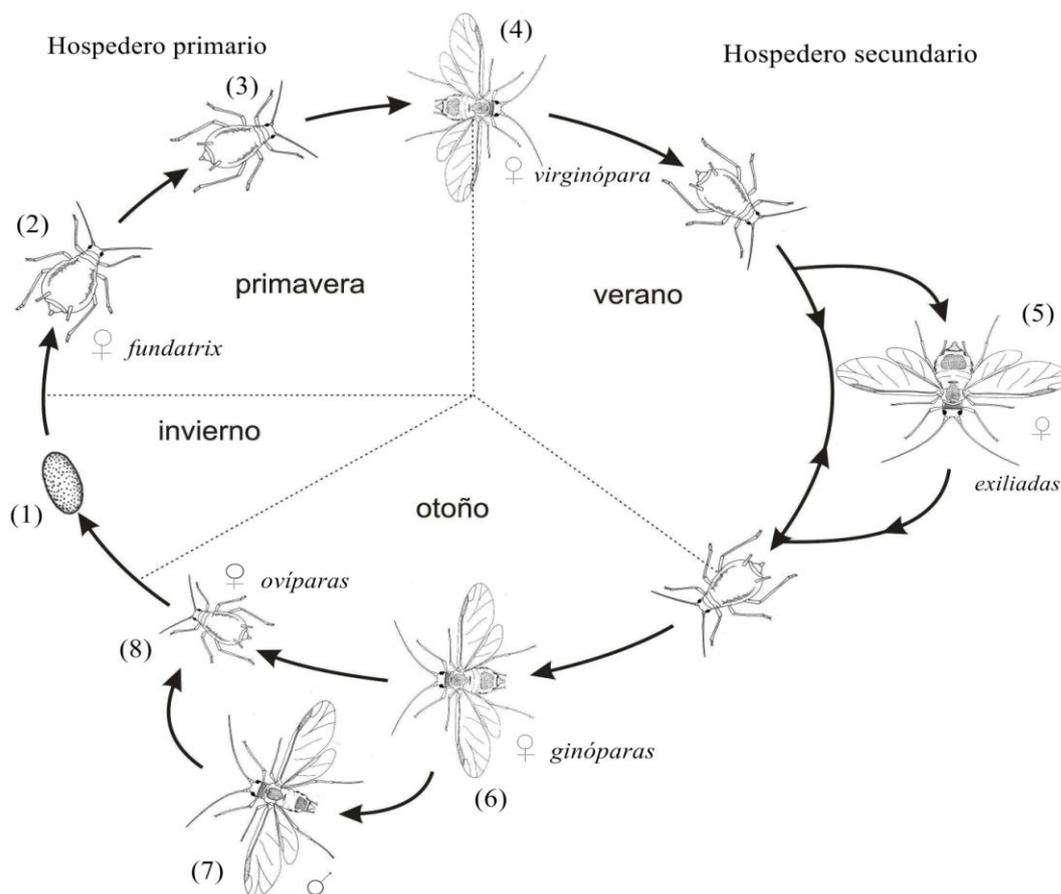


Fig. i: Ciclo de vida de la especie *Myzus persicae* (Sulzer). El ciclo es heteroico holocíclico, es decir se desarrolla sobre un hospedero primario y otro secundario y presenta una fase sexual y una partenogenética (Tomado y modificado de García Marí et al. 1989a).

En lugares donde las condiciones climáticas son lo suficientemente favorables como para que los áfidos pasen el invierno en una forma activa, el ciclo de los áfidos es anholocíclico (pérdida de la fase sexual), o sea que la reproducción se realiza por partenogénesis originando formas ápteras y aladas (Blackman y Eastop, 1985). La escasez de alimento y/o las condiciones ambientales desfavorables, actúan como estímulos para el desarrollo de las formas aladas.

En la mayoría de las especies conocidas en la Argentina se observa la aparente pérdida de la fase sexual, aunque aún resta por conocer la biología de estos insectos en gran parte del territorio (Delfino, 2004).

### Control químico

El control de áfidos en cultivos agrícolas se basa predominantemente en el uso de insecticidas químicos. Los de uso más extendido pertenecen a los grupos de los organofosforados (clorpirifós, dimetoato), organoclorados (endosulfán), neonicotinoides (imidacloprid, timatoxam), carbamatos (pirimicarb) oximacarbamato (aldicrab, metomil) y piretroides (cipermetrina), entre otros (CASAFE, 2007).

La mayoría de los productos mencionados tienen acción sistémica, es decir al ser aplicados en una planta estos penetran hasta los tejidos conductores de la misma y se reparte a través de ellos por toda la planta. De esta forma aunque el producto al aplicarse no alcance toda la planta, no cubra toda su superficie o no caiga sobre los insectos, la planta se convierte en venenosa para la plaga. Son muy eficaces para el control de insectos con aparato bucal chupador. Algunos actúan por contacto, ingestión e inhalación. Además de los insecticidas, los fungicidas y los fertilizantes se suman al paquete tecnológico utilizado en sistemas de cultivos. La utilización masiva de agroquímicos puede dar lugar a problemas en la salud humana y ambiental como así también efectos adversos en la fauna no blanco asociada.

Entre los riesgos ambientales que trae aparejado el uso de insecticidas químicos se mencionan la toxicidad para aves, peces y organismos susceptibles como las abejas. Otro problema es el desarrollo de resistencia, como ha sido registrado para especies tales como *Aphis gossypii* (Glover) (Moore *et al.*, 1996), *M. persicae* (Foster *et al.*, 2000), y *Schizaphis graminum* (Shufron *et al.*, 1997).

### Manejo integrado de Plagas

Debido a la necesidad de desarrollar métodos de control más selectivos y compatibles con el ambiente, en las últimas décadas se ha incrementado el interés por el Manejo Integrado de Plagas (MIP). El MIP se define como un sistema que reúne de manera compatible y simultánea todos los métodos de control posibles (control químico, cultural, biológico y uso de variedades resistentes) para mantener al nivel de la plaga por debajo de los niveles poblacionales que produzcan daño económico al cultivo (Kogan, 1998; Pérez Moreno, 2000; Romero 2004). El principal objetivo es integrar diferentes estrategias de control de plagas para reducir al mínimo el uso de plaguicidas químicos.

El Control Biológico (CB) forma parte del MIP y se define como “el uso de organismos vivos para suprimir la densidad de la población o el impacto de un organismo plaga específico, por lo que resulta menos abundante o menos perjudicial de lo que habría sido en ausencia de aquellos organismos”. Mientras que se reserva la denominación de control microbiano para describir el uso de micro-organismos como agentes de control biológico.

Dentro del control biológico se incluyen cuatro estrategias:

1. Control Biológico Clásico: hace referencia a la introducción intencional de una especie exótica como agente de CB, generalmente co-evolucionado para el establecimiento permanente y el control de la plaga a largo plazo.
2. Control Biológico Inoculativo: implica la liberación intencional de un organismo vivo como un agente de control biológico con la expectativa de que se multiplique y controle la plaga durante un largo período, pero no de manera permanente.

3. Control Biológico Inundativo: se refiere al uso de organismos vivos para el control de plagas cuando se logra el control exclusivamente por los propios organismos liberados.
4. Control Biológico Conservativo: involucra la modificación del ambiente o las prácticas existentes para proteger e incrementar las condiciones de vida de los enemigos naturales específicos de las plagas para de esta manera reducir el efecto de los organismos perjudiciales.

En el contexto del MIP, cualquiera de las estrategias de Control Biológico apunta a mantener la densidad de la plaga por debajo del umbral de daño económico. El umbral de acción, que a veces también se denomina umbral de daño económico, se define como la densidad de la población de la plaga a la cual se deben tomar medidas de control, para prevenir que continúe creciendo e impedir que alcance el nivel en que produce daño económicamente significativo. El establecimiento de umbrales de acción es una herramienta básica para la toma de decisiones en cualquier programa de manejo de plagas.

#### Hongos Entomopatógenos

En la búsqueda de alternativas al control químico se ha promovido el estudio y uso de organismos entomopatógenos en programas de control de insectos plagas a nivel mundial (Shah & Pell, 2003). Entre estos organismos, los hongos entomopatógenos, constituyen un importante grupo de patógenos de insectos plaga. Algunas de las ventajas que presentan los hongos entomopatógenos para ser utilizados en programas de control microbiano de insectos son: alta especificidad, dispersión natural, posibilidad de cultivo *in vitro* manteniendo la patogenicidad, inocuidad para vertebrados y la posibilidad de provocar un control permanente una vez establecidos en el ambiente. Asimismo, otra ventaja importante que presentan estos patógenos es que la infección generalmente se produce por contacto, a través del tegumento de los insectos, no necesitando ser ingeridos por los mismos, siendo este un factor importante en programas de control de insectos hemípteros.

#### Potencial de los Hongos Entomophthorales como agentes de control de áfidos

Entre los entomopatógenos, los hongos Entomophthorales poseen su mayor diversidad de especies como patógenos de pulgones (Hemiptera: Aphididae) (Humber 1991) siendo en esta familia de insectos donde se han descrito un total de 29 especies.

Los hongos incluidos en el Orden Entomophthorales, pertenecen a la Clase Entomophthoromycetes, Phylum Entomophthoromycota. El Orden está constituido por cuatro familias: Ancylistaceae, Completoriaceae, Entomophthoraceae y Meristacraceae (Humber, 2012a). Las especies patógenas de artrópodos se ubican en las familias Ancylistaceae (género *Conidiobolus*) y Entomophthoraceae (11 géneros). Recientemente, la Familia Neozygitaceae ha sido excluida del Orden Entomophthorales formando parte, en la nueva clasificación, de un nuevo Orden: Neozygiales y de una nueva Clase: Neozygitomycetes (Humber, 2012a). En el presente trabajo se ha considerado la especie como patógeno de áfidos aunque ya no se considere dentro del grupo de los Entomophthorales.

De las 185 especies de Entomophthorales entomopatógenos, 176 atacan insectos de la mayoría de los órdenes. Nueve especies son conocidas como patógenas de arácnidos, siete de ácaros y dos de falángidos. La mayoría de las especies (34.4% correspondiendo a 68 especies) han sido citadas en Diptera seguida de Hemiptera (antes Homoptera) con el 24.3%.

Generalmente los insectos infectados con Entomophthorales mueren en lugares expuestos, en la parte superior de las plantas y se mantienen adheridos al sustrato vegetal mediante la fijación a las paredes u otras partes de las plantas. Los insectos gregarios, como áfidos y ácaros, normalmente permanecen y mueren en las colonias.

#### Biología y Ecología de los Hongos Entomophthorales.

Los hongos entomophthorales tienen un conjunto de estructuras bien definidas, que se describen a continuación y se esquematizan en la Fig. ii:

- Protoplastos: se forman dentro del cuerpo del insecto y se encargan del crecimiento vegetativo del hongo. Pueden estar presentes o ausentes. Tienen diferentes formas que son específicas de las especies.

- Cuerpos hifales: están presentes en todas las especies, ya sea en la primera etapa del huésped infectado o se forman a partir de protoplastos. Tienen una pared celular que les da la forma típica. La forma es específica de la especie o del género. El número y tamaño de los núcleos en los cuerpos hifales maduros es con frecuencia específico de las especies o de un grupo. Los cuerpos hifales originan conidióforos, cistidios, rizoides y esporas de resistencia. Observaciones microscópicas sugieren que los cistidios y los rizoides son formados desde cuerpos hifales especializados.
- Conidióforos: emergen desde los cuerpos hifales y pueden ser ramificados o no ramificados. Ambos emergen desde un único tubo germinativo de un cuerpo hifal. En los ramificados, las ramificaciones son limitadas hasta la porción distal y son conocidas dos tipos: dicotómicas y digitadas. La última es la más común. Los conidióforos de la mayoría de las especies se amplían terminalmente de manera que un cuello se forma antes de la formación del conidio.
- Conidios: son esporas de origen asexual, no móviles. Su función es la diseminación de la enfermedad y la infección de nuevos hospedadores. Existen dos tipos principales:
  - Conidios primarios: son formados por los conidióforos y activamente proyectados. Los conidios primarios producidos en conidióforos no ramificados contienen dos o más núcleos; mientras que aquellos producidos desde conidióforos ramificados contienen un sólo núcleo. La forma y dimensiones de los conidios primarios son los criterios más importantes para la identificación de las especies de hongos Entomophthorales. El conidio está formado por el cuerpo del conidio y la papila. Algunas papilas tienen una forma específica.
  - Conidios secundarios: el número de tipos de conidios secundarios que se forman y el modo de formación son criterios importantes a nivel de género. En todos los géneros de Entomophthoroideae excepto en *Eryniopsis* y en pocas especies de *Entomophaga* un único tipo de conidio secundario es formado, mientras todos los géneros de *Erynioideae* forman al menos dos tipos. La forma del tipo I corresponde a la del primario, mientras que el tipo II difiere de este.

Generalmente, dos tipos de conidios secundarios son formados por especies de *Neozygites*. Ambos tipos son formados en conidióforos secundarios gruesos, cortos o tubos germinales del conidio primario. Los del tipo II son llamados capiliconidios. Conidios secundarios del tipo I son activamente descargados, mientras los del tipo II lo hacen mediante descarga pasiva.

- Núcleo: los núcleos difieren en la forma en que se dividen (específico de la familia), en el número por estructura, especialmente por conidio, y en su tamaño. En ocasiones, su disposición en los cuerpos hifales y en los conidióforos es importante como criterio taxonómico.
- Esporas de resistencia: son estructuras de paredes gruesas cuya función es asegurar la supervivencia del hongo en condiciones adversas. Son formadas asexualmente desde un cuerpo hifal (acigosporas) o sexualmente desde la conjugación de dos cuerpos hifales (cigosporas). El tipo de formación no es con frecuencia claramente visible. La forma y dimensiones de las estructuras son los caracteres más importantes. No son infectivas.
- Rizoides: estas estructuras se encargan de fijar el hospedador al sustrato. Se forman en el lado ventral del hospedador poco antes de la muerte; por lo general surgen de las partes del cuerpo débilmente quitinizadas como membranas o articulaciones intersegmentales. En ocasiones, se originan a partir de partes específicas del cuerpo (por ejemplo, de las piezas bucales en algunas especies de *Entomophthora*). Hay dos tipos básicos de rizoides: monohifales o compuestos. Los rizoides monohifales consisten en una única hifa que más o menos mantiene el diámetro constante a lo largo de toda la longitud. El rizoide compuesto está formado por un conjunto de hifas que se pegan entre sí y forman una estructura final común. Ambos tipos normalmente no contienen citoplasma o núcleos en la madurez.
- Cistidios: su función es la ruptura de la cutícula del hospedador por presión mecánica. Contienen citoplasma y núcleos. De forma en general ahusada, rara vez con un extremo ensanchado o ramificado.

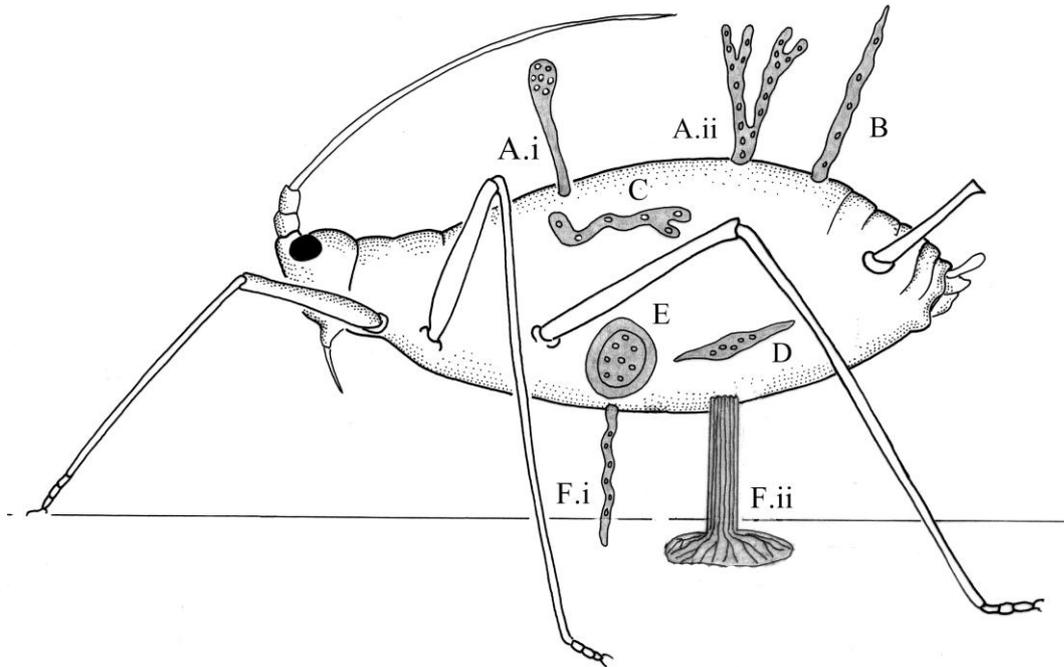


Fig. ii: Esquema representativo de las estructuras típicas de los hongos entomofitos. A.i: conidióforo simple; A.ii: conidióforo ramificado, B: cistidios; C: cuerpos hifales; D: protoplastos; E: esporas de resistencia; F.i: rizoides monohifales; F.ii: rizoides compuestos. (Tomado y modificado de: “Arthropod-pathogenic Entomophthorales”, Keller 2007).

### El ciclo de vida de los hongos Entomophthorales

Cada sistema patógeno-hospedador exhibe peculiaridades propias. Algunas especies de hongos por ejemplo tienen únicamente una única especie de hospedador, otras tienen muchas, sin embargo el ciclo de vida de los hongos entomopatógenos tiene muchas similitudes. Básicamente puede ser dividido en un ciclo de conidios y uno de esporas de resistencia (Fig. iii). El primero facilita la propagación y la diseminación de la enfermedad y el último sirve para la supervivencia bajo condiciones desfavorables. En muchas especies, las esporas de resistencia son desconocidas y otras estructuras deben ser capaces de resistir las condiciones adversas que pudieran ocurrir.

Las infecciones son siempre debidas a los conidios que se adhieren a la cutícula y forman un tubo de penetración. La penetración a través de la cutícula del hospedador

usualmente deja un orificio triangular. La multiplicación dentro del hospedador se desarrolla por protoplastos o por cuerpos hifales. Estas estructuras colonizan el abdomen o, más comúnmente, todo el cuerpo del hospedador. El agotamiento de nutrientes detiene el crecimiento vegetativo. Los hospedadores de la mayoría de las especies mueren en esta etapa. Algunas especies, sin embargo, esporulan mientras el hospedador aún está vivo y móvil.

Normalmente, los cuerpos hifales comienzan a formar un solo conidióforo. Los conidióforos penetran la cutícula del hospedador por presión mecánica y forman los conidios primarios, que son activamente proyectados. Dentro de unas pocas horas un conidio secundario puede ser formado lateralmente en el primario. En algunos géneros los conidios secundarios son más virulentos que los primarios (Bellini *et al.*, 1992).

El ciclo de esporas de resistencia se estima que comienza generalmente de la misma manera que el ciclo conidial. Se desconoce en qué etapa es inducida la formación de esporas de resistencia y si hay cambios a nivel nuclear durante su formación y maduración. Las esporas de resistencia pueden cigosporas o acigosporas. Su germinación y la formación de conidios germinales es conocida únicamente para unas pocas especies.

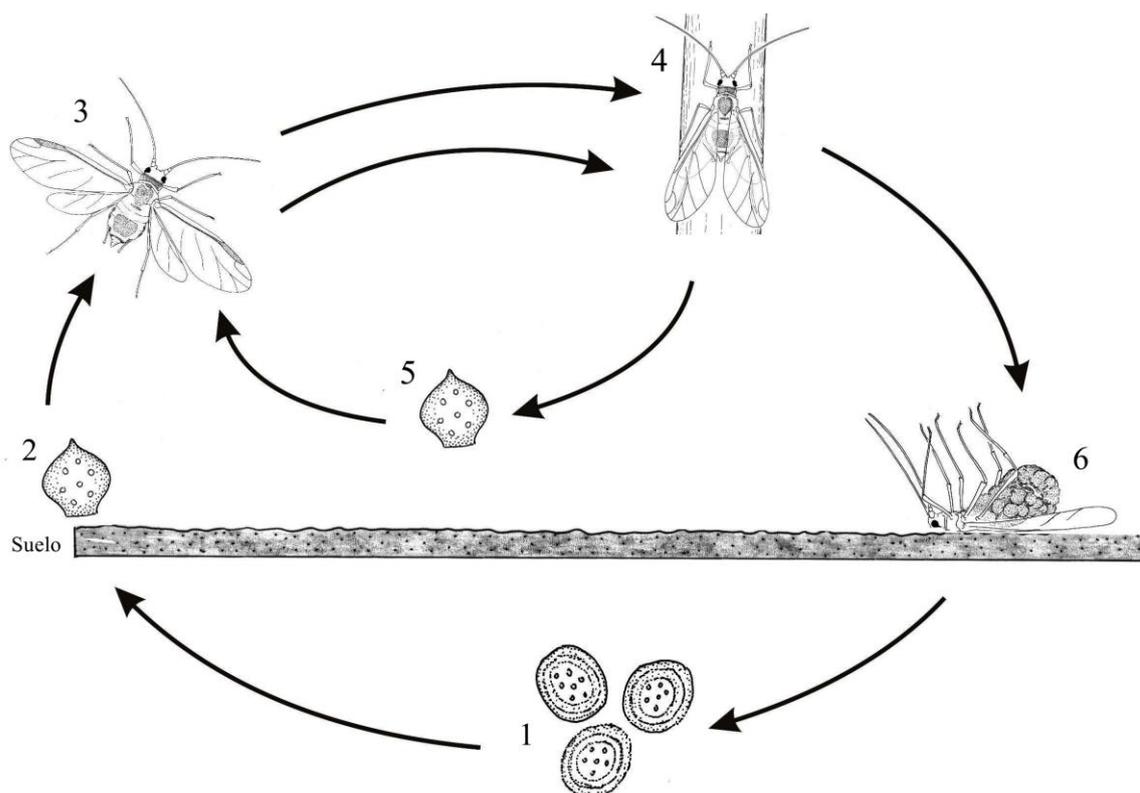


Fig. iii: Ciclo de vida de *Entomophthora* sp. en áfidos. 1: Esporas de resistencia en el suelo; 2: Conidio asexual, infectivo son producidos por la estructura de supervivencia del hongo; 3: conidios asexuales infectan estadios susceptibles del hospedador; 4: luego de un período de incubación el hospedador muere manteniéndose adherido al sustrato por rizoides; 5: desde el hospedador esporulado son producidos conidios que volverán a infectar a nuevos hospedadores; 6: cuando el número de hospedadores susceptibles disminuye o cuando las condiciones ambientales son desfavorables algunos individuos infectados no producen conidios infectivos, sino estructuras de supervivencia (esporas de resistencia). Las esporas de resistencia sobreviven durante las condiciones desfavorables en el suelo y producirán conidios infectivos el próximo año (Tomado y modificado de: “Arthropod-pathogenic Entomophthorales”, Keller 2007).

#### Prevalencia de las infecciones fúngicas

Los hongos entomophthorales son importantes factores de mortalidad de áfidos en el campo (Keller, 2006). Estudios intensivos de hongos entomophthorales contribuyen al entendimiento de su potencial epizootiológico, fenología y manejo en cultivos agrícolas (Pell *et al.*, 2001). Con frecuencia causan epizootias que pueden rápidamente reducir las densidades de áfidos (Steinkraus *et al.*, 1995), esta característica

los convierte en excelentes candidatos para ser utilizados como agentes de control biológico de insectos plaga.

El término prevalencia es definido como “el número de hospedadores afectados con la enfermedad en un momento y tiempo determinados” (Fuxa & Tanada, 1987). Se calcula como:

$$\frac{\text{Proporción de áfidos infectados}}{\text{Número de áfidos totales en la muestra}} \times 100$$

La prevalencia de los hongos Entomophthorales en poblaciones de insectos puede alcanzar niveles muy altos en ciertas épocas del año y pueden permitir la eliminación de las poblaciones de áfidos plaga. Esta observación sugiere que existe un alto potencial de utilización de hongos Entomophthorales para control microbiano/biológico de insectos y ácaros. La producción *in vitro* de estos hongos es difícil para la elección de un método de aplicación de tipo inundativo, sin embargo el grupo de hongos presenta un elevado potencial para estrategias de Control Biológico Conservativo (CBC). Este tipo de control es una elección adecuada para hongos Entomophthorales, pero a la vez es desafiante ya que se respalda en un profundo conocimiento de la biología y ecología del hospedador y del patógeno así como de los efectos e interacciones entre los factores ambientales y prácticas de manejo que se realizan en relación con el insecto “blanco”. Debido a esto, se propone en este trabajo, estudiar, evaluar y analizar la presencia de infecciones fúngicas en relación a factores bióticos y abióticos, intentando dilucidar las condiciones en las cuales ocurren las epizootias que permiten reducir las poblaciones de áfidos plaga. Entre los factores más importantes que podrían afectar la actividad de los hongos se destacan, entre los factores bióticos, la densidad del hospedador, la presencia de los estadios de desarrollo susceptibles a las infecciones y la presencia de otros enemigos naturales; y por otro la temperatura, la humedad y el uso de insecticidas se incluyen entre los factores abióticos.

#### Factores que influyen en la transmisión de hongos patógenos

La transmisión es un factor ecológico clave que debe ser comprendido antes que los entomopatógenos puedan ser manipulados. “La comprensión de los mecanismos de

transmisión de un entomopatógeno dado permitirá la predicción de su capacidad de propagarse dentro de una población huésped y, en algunos casos, de su potencial como agente de control microbiano aplicado" (Harper, 1987). Según Hajek y St. Leger (1994): "la dispersión de propágulos infectivos a un nuevo huésped representa la parte más arriesgada del ciclo de vida del hongo. Los procesos de producción de esporas y la descarga, dispersión de esporas, y la supervivencia de las esporas y la germinación con frecuencia dependen de las condiciones ambientales". La transmisión de los hongos patógenos es afectada por muchos factores incluyendo: biología y estructura del hospedador, características del patógeno, características de la planta hospedadora y factores ambientales.

### 1. Factores relacionados al hospedador

Entre estos se incluyen el efecto de la biología y morfología de los áfidos y los efectos del estadio de desarrollo del áfido en la transmisión. Respecto al primero, los áfidos constituyen un buen ejemplo de un taxón que es exitosamente explotado por hongos entomopatógenos. Muchas características de los áfidos juegan un rol en el desarrollo de epizootias de hongos. Los áfidos son pequeños, insectos hemimetábolos, de cuerpos blandos, con ciclos de vida rápido, esperanza de vida relativamente corta, a menudo partenogenéticos y vivíparos y que producen formas sin alas (ápteros) y formas aladas. Debido a que los áfidos son hemimetábolos, las ninfas viven y se alimentan en colonias con los adultos, resultando que toda la población es susceptible al ataque por patógenos fúngicos. Esto se diferencia de la dinámica de los patógenos en insectos pertenecientes a los Órdenes Hymenoptera, Lepidoptera, Diptera, y otros insectos hemimetábolos en los cuales los entomopatógenos usualmente se restringen al estado de larva o adulto. Los cuerpos pequeños y blandos (débilmente esclerotizados) de los áfidos hacen que presenten relativamente pocas barreras a la penetración de hongos patógenos. El pequeño tamaño de los áfidos puede también estar relacionado con el poco tiempo requerido por algunos hongos patógenos para matar a su hospedador.

Densas poblaciones de áfidos con frecuencia favorecen la rápida diseminación del patógeno. La densidad de la población hospedadora ha sido considerada como el principal factor que determina los niveles de infección en algunos sistemas de cultivo-

áfido-patógeno (Feng *et al.*, 1992; Rabasse and Robert, 1975; Robert *et al.*, 1973; Soper and MacLeod, 1981; Wilding and Perry, 1980).

Kim y Roberts (2012) sugirieron que los estadios ninfales tempranos de áfidos de algodón son menos susceptible porque pueden escapar a la infección fúngica debido, al menos en parte, a la combinación de tres factores: bajo número de conidios adheridos a sus cutículas, a los bajos niveles de germinación de conidios y a la rápida muda que remueven los conidios antes de que el tubo germinativo penetre dentro de la hemolinfa del hospedador.

Respecto al efecto del estado de desarrollo del áfido, la alta susceptibilidad a la infección de las formas aladas son muy importantes en la transmisión de los patógenos, ya que estas formas infectadas pueden volar y dispersar los patógenos entre sitios. Esto ha sido demostrado en China (Feng *et al.*, 2004). Además, la habilidad de volar largas distancias mientras están infectados es un factor importante en el desarrollo de epizootias (White *et al.*, 2000).

## 2. Factores relacionados al patógeno

Entre los factores relacionados al patógenos los siguientes pueden tener un efecto en la transmisión: descarga activa o pasiva de conidios; tamaño, forma y número de conidios, mecanismos de fijación y mecanismos de supervivencia.

## 3. Efectos relacionados a la planta hospedadora

Los áfidos son pequeños herbívoros que están estrechamente relacionados a sus plantas hospedadoras. La presencia de tricomas en las hojas y tallos, la arquitectura y tamaño de la planta, la presencia de ceras superficiales, los compuestos químicos de las plantas y la existencia de plantas “refugio” son algunas de las características que pueden tener efectos en la transmisión (Duetting *et al.*, 2003).

## 4. Efectos relacionados a los factores ambientales

El ambiente juega el principal rol en la supervivencia y transmisión de todos los patógenos. La humedad relativa, luz del sol, temperatura, lluvia, el viento y las sustancias químicas artificiales afectan la transmisión de los hongos patógenos. Cada especie de hongo tiene diferentes requerimientos de humedad y temperatura. Algunas

especies de Entomophthorales son más comunes en regiones tropicales y subtropicales, mientras que otras predominan en zonas templadas o frías.

\* Efecto de la temperatura y de la luz: los extremos de temperatura tienen un efecto en la supervivencia de los patógenos, y su capacidad para crecer, esporular y germinar. Se ha demostrado que la luz tiene efectos en la producción y germinación de esporas. Respecto a la temperatura, Glare *et al.* (1986) demostraron que afectó la producción y la descarga de conidios primarios de *Zoophthora phalloides* Batko desde cadáveres de *M. persicae* esporulados, con grandes cantidades de conidios producidos a 10, 15 y 20°C pero muy pocos a 4 o 25 °C.

\* Agroquímicos: las sustancias químicas aplicadas a los cultivos pueden afectar la transmisión de los hongos patógenos (Steinkraus, 2006). Los insecticidas pueden alterar la dinámica de transmisión de los hongos patógenos al reducir a densidades muy bajas las poblaciones de áfidos, afectando el potencial de transmisión y desarrollo de epizootias. Respecto a los fungicidas, varios autores indican que estos pueden suprimir el desarrollo de epizootias de hongos entomopatógenos (Kish and Allen, 1978; Smith and Hardee, 1993; Wells *et al.*, 2000, Ruano-Rossil *et al.*, 2002;).

\* Humedad relativa (HR): es el factor más crítico en la transmisión de hongos patógenos. Los hongos generalmente requieren alta humedad para sobrevivir, germinar y esporular (Steinkraus, 2006). Glare *et al.* (1986) demostraron que la esporulación de *Z. phalloides* desde cadáveres de *M. persicae* ocurrió únicamente con porcentajes de humedad relativa del 100%. Los mismos autores mostraron que la humedad relativa influyó en la germinación de conidios primarios de *Z. phalloides*. Altos porcentajes de conidios germinaron a 98 y 100%, mientras que ninguno germinó a 94 o 91% de HR. Wilding (1969), Steinkraus y Slaymaker (1994) y Brobyn *et al.* (1985) demostraron que la HR es un factor clave en la esporulación y germinación de las especies *Entomophthora thaxteriana* Hall & Bell, *Pandora neoaphidis* (Remaudière and Hennebert) Humber y *Neozygites fresenii* (Nowak.) Remaud. & Keller. Estos autores coincidieron en que elevados porcentajes de HR favorecieron la esporulación y germinación de las especies de hongos.

## ANTECEDENTES

Aproximadamente 30 especies de hongos entomophthorales son conocidas por causar micosis en poblaciones de áfidos (Humber, 1991; Keller, 1991, 1997, 2006; Bałazy, 1993). Las predominantes de Entomophthorales en pulgones son *P. neoaphidis*, *Entomophthora planchoniana* Cornu *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko, *Zoophthora* sp., (Entomophthoromycotina: Entomophthorales) *Conidiobolus obscurus* (Hall & Dunn) Remaud. & Keller, *Conidiobolus thromboides* Drechsler (Ancylistaceae) y las especies *Neozygites floridana* (Weiser & Muma) Remaud. & Keller y *N. fresenii* (consideradas actualmente en la Clase Neozygitomicetes) sobre cultivos vegetales (Dean & Wilding, 1973; Dedryver, 198; Steenberg & Eilenberg, 1995). *Pandora neoaphidis* es el patógeno de áfidos más común en regiones templadas. Es además el agente más frecuentemente encontrado causando epizootias en poblaciones naturales de áfidos (Nielsen *et al.*, 2003) y ha recibido una atención considerable como un potencial agente de control biológico (Steenberg and Eilenberg, 1995).

Numerosas publicaciones registran asociaciones entre áfidos-hongos entomophthorales en distintas partes del mundo (Feng *et al.*, 1992; Bałazy, 1993; Keller, 1997; Hatting *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2001; Barta & Cagáñ, 2003a,b; Steinkraus & Boys, 2005). Tales asociaciones siguen siendo en gran parte inexploradas en Sudamérica (Lázzari, 1985). En la Argentina los primeros trabajos sobre hongos patógenos de insectos fueron publicados por Spegazzini (1880), Fawcett (1915), y Marchionatto (1934). El conocimiento de los hongos Entomophthorales es escaso y su distribución geográfica es restringida. López Lastra *et al.* (2006) registraron *Entomophthora ferdinandii* Keller causando infecciones naturales en *Musca domestica* (L.). La especie *Entomophaga grylli* (Fresen.) Batko fue registrada infectando diferentes especies de ortópteros en Buenos Aires y en La Pampa (Fresa, 1971; Lange, 1996), *Entomophthora* sp. fue identificado como patógeno de *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) en Buenos Aires (Fresa 1979). *Pandora gammae* (Weiser) Humber fue registrada infectando a *R. nu* en Santa Fe (Diez y Gamundi, 1985), a *R. nu* y a *Anticarsia gemmatalis* Hübner en Buenos Aires (López Lastra y Scorsetti, 2006), y a organismos pertenecientes a *Plusiinae* spp. en Córdoba y en Rafaela (Santa Fe) (Eldestein y Lecuona, 2003). La mayoría de estas publicaciones hacen referencia a

estudios taxonómicos y de evaluación de su virulencia o patogenicidad, existiendo escasa información sobre su comportamiento en condiciones de campo.

En referencia a hongos entomophthorales como patógenos de áfidos no se conocen en Argentina registros previos en cultivos de cereales. Únicamente, en arroz ha sido registrada una especie fúngica infectando un hemíptero plaga (Toledo *et al.*, 2008) en el área del Gran La Plata, provincia de Buenos Aires. En cultivos hortícolas se han citado hongos entomophthorales como patógenos de áfidos plaga únicamente en la provincia de Buenos Aires donde se han registrado seis especies de hongos entomophthorales, entre ellas *C. obscurus* en *Nasonovia ribisnigri* (Mosley, 1841), *Brevicoryne brassicae* (L.) y *Myzus* sp.; *E. planchoniana* en *N. ribisnigri*, *Aphis fabae* Scopoli, *A. gossypii*, *Myzus* sp., *M. persicae*; *N. fresenii* en *Brevicoryne brassicae* L., *Myzus* sp., *A. fabae*; *P. neoaphidis* en *N. ribisnigri*, *A. fabae*, *B. brassicae*, *Myzus* sp., *M. persicae*, *Lipaphis erysimi* Kalt., *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Capitophorus elaeagni* (Del Guercio); *Zoophthora* sp. en *C. elaeagni*. *Z. radicans* en *N. ribisnigri*, *M. euphorbiae*, *A. fabae*, *M. persicae*, *B. brassicae*, *C. elaeagni* (Scorsetti *et al.*, 2006). Otros registros de hongos en áfidos los constituyen las especies *Batkoa* sp. en *N. ribisnigri*, *Conidiobolus* sp. en *A. gossypii*, *E. planchoniana* en *Chaetosiphon fragaefolii* (Cock.) (López Lastra y Scorsetti, 2007).

Por otro lado, estudios de prevalencia y estacionalidad de hongos han sido llevados a cabo en distintas partes del mundo y en distintos sistemas de cultivos. Existen registros de estudios previos de la prevalencia de hongos entomophthorales en áfidos. Hatting *et al.* (2000) citan prevalencias de *P. neoaphidis* en *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) en cultivo de trigo con niveles de hasta el 50%. Asimismo, han sido registradas epizootias en alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Pickering y Gutierrez, 1991), trigo (*Triticum avenae* L.) (Feng *et al.*, 1991), cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Feng *et al.*, 1992) y espinaca (*Spinacia oleracea* L.) (McLeod *et al.*, 1998). En Sudamérica hay poca información acerca de la prevalencia de estos hongos en insectos plagas de la agricultura. Delalibera *et al.* (2000) registran epizootias causadas por *Neozygites tanajoe* Delalibera, Hajek & Humber sp. nov. (Entomophthoromycotina: Entomophthorales) en *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae) en Brasil. Alzugaray *et al.* (1998) citan epizootias de Entomophthorales en Lepidopteros en Uruguay. En

Argentina, Scorsetti *et al.* (2010) registraron en cultivo de lechuga a la especie *P. neoaphidis* infectando a *N. ribisnigri* con una prevalencia de 56.6% (n = 30).

Respecto a los efectos de los factores que influyen en la ocurrencia de las micosis, estudios previos en la estacionalidad de hongos entomophthorales en poblaciones de insectos en Argentina encontraron que las infecciones fúngicas fueron más comunes en la estación otoño-invierno (López Lastra *et al.*, 2003, 2006; Toledo *et al.*, 2008) y fueron coincidentes con períodos de alta humedad relativa y bajas temperaturas. En cuanto a factores bióticos, Scorsetti *et al.* (2010) encontraron que el 66% de la variabilidad en la infectividad de *P. neoaphidis* fue explicada por la densidad de áfidos vivos y encontraron que *N. ribisnigri* fue igualmente susceptible a la infección fúngica a través de su ciclo de vida.

No se han realizado estudios previos de identificación y de la diversidad de hongos patógenos de insectos plagas ya sea en sistemas agrícolas intensivos y/o extensivos en Santa Fe. Asimismo no se han registrado colecciones de aislamientos ni estudios de epizootiología y prevalencia de los hongos. Debido a ello es de relevante interés profundizar en estos aspectos. La gran diversidad de especies de áfidos plaga en cultivos de importancia económica en la Argentina, no solo debido a su densidad sino también a la transmisión de diversas virosis, constituyen un relevante y novedoso enfoque al estudio de la temática propuesta.

## **HIPÓTESIS**

En base al marco teórico propuesto, se plantean las siguientes hipótesis:

1. Más de una especie de hongos Entomophthorales infectarán a pulgones en los cultivos de cereales, hortícolas y en la vegetación de crecimiento espontáneo asociada a los cultivos en las regiones del centro-oeste de la región pampeana. La diversidad y ocurrencia de hongos Entomophthorales estará relacionada con la planta hospedadora, la especie de áfido hospedador y las condiciones meteorológicas.
2. Los hongos patógenos de áfidos pueden ser identificados y aislados de sus hospedadores originales en medios de cultivos artificiales.
3. Las infecciones naturales causadas por Hongos Entomophthorales en áfidos plaga de cultivos agrícolas, ya sean intensivos o extensivos, pueden alcanzar un porcentaje de 50% o más.
4. Existen diferencias en las infecciones fúngicas entre los estadios de desarrollo.
5. Los niveles de infección están determinados por factores bióticos (densidad del hospedador y estados de desarrollo del hospedador) y abióticos (humedad relativa y temperatura).

## **OBJETIVOS GENERALES**

Los principales objetivos de la presente tesis fueron realizar un relevamiento de las especies de hongos patógenos de pulgones (Hemiptera: Aphididae) en sistemas agrícolas intensivos y extensivos en la provincia de Santa Fe, identificar y aislar las especies de hongos patógenos de áfidos y determinar la prevalencia de las infecciones fúngicas en los sistemas de cultivos estudiados asociando los niveles de infecciones fúngicas a factores ya sea bióticos o abióticos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos específicos son enunciados a continuación y fueron organizados por Capítulo:

---

**Capítulo I: *Identificación y Aislamiento de Hongos Entomophthorales***

1. Identificar las especies de hongos morfológicamente
2. Identificar las especies de hongos molecularmente.
3. Aislar las especies de hongos entomophthorales.

**Capítulo II: *Hongos Entomophthorales patógenos de áfidos en Cereales***

1. Releva los hongos patógenos de áfidos en cultivos de *Triticum aestivum*, *Avena sativa* y *Sorghum bicolor* en Santa Fe.
2. Identificar las especies de hongos patógenos.
3. Determinar la prevalencia de las infecciones fúngicas en cada uno de los cultivos y en cada uno de los sitios.
4. Investigar la relación entre el nivel de infección fúngica y la densidad de la población hospedadora.
5. Comparar el número de áfidos infectados entre los estadios de desarrollo del hospedador.
6. Observar los datos de temperatura y humedad relativa en relación a la prevalencia de las infecciones fúngicas.

**Capítulo III: *Hongos Entomophthorales patógenos de áfidos en Hortícolas***

1. Releva cultivos de *Lactuca sativa*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Solanum melongena*, *Capsicum annuum*, *Brassica oleracea* var. *italica*, *Solanum lycopersicum*, *Phaseolus vulgaris* y hospederas alternativas relacionadas en el cinturón hortícola santafesino.
2. Identificar los hongos patógenos como factor de mortalidad de áfidos.
3. Estudiar la dinámica poblacional de los áfidos asociada a los niveles de infecciones fúngicas.
4. Determinar la prevalencia de las infecciones fúngicas en cada uno de los cultivos.
5. Investigar la relación entre el nivel de infección fúngica y la densidad de la población hospedadora.
6. Comparar el número de áfidos infectados entre los estadios de desarrollo del hospedador.

7. Relacionar el porcentaje de infección fúngica con las variables temperatura y humedad relativa.

Capítulo IV: *Potencial de los Hongos Entomophthorales en estrategias de Control Biológico Conservativo.*

1. Identificar potenciales asociaciones de plantas-áfidos-hongos como potenciales reservorios de hongos entomophthorales.
2. Determinar los niveles de infecciones fúngicas en el cultivo de *T. aestivum* y en las hospederas asociadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

### Descripción del área de estudio

La región pampeana argentina (situada entre 28 y 40°S y 68 y 57°O) es una de las más importantes áreas para la actividad agrícola y ganadera en el mundo. Es una amplia zona de aprox. 52 millones de has de tierras aptas para la agricultura y ganadería (Hall *et al.*, 1992; Viglizzo y Roberto, 1998). El estudio se llevó a cabo en la provincia de Santa Fe (Fig. iv) y abarcó dos zonas principales de la región centro-norte de la región pampeana: el Departamento Castellanos, en el cual fueron involucrados cultivos extensivos pertenecientes a la localidad de Rafaela y Departamento La Capital, en el que se extiende el cinturón hortícola santafesino por lo que fueron estudiados sistemas intensivos en dos de las localidades que lo integran: Monte Vera y Recreo. La localización geográfica de cada establecimiento involucrado en los monitoreos se determinó con un instrumento de posicionamiento geográfico (GPS Efix, Garmin).

### Características del área de estudio

Relieve: las localidades se encuentran ubicadas en dos grandes unidades fisiográficas, la Pampa llana santafesina y los Bajos submeridionales del sur. En esta zona predominan los paisajes suavemente ondulados y las planicies extendidas ligeramente deprimidas. La heterogeneidad en estos ambientes se evidencia en la productividad de los cultivos (Hein *et al.*, 1989).

Suelo: el suelo de las regiones es el típico “Argiudol” que manifiesta una aptitud agrícola-ganadera heterogénea. Son suelos profundos y moderadamente bien drenados, que se han desarrollado en un ambiente húmedo denominado “údico” y poseen un horizonte subsuperficial enriquecido en arcilla denominado “argílico” (de allí deriva su nombre) (Baillie, 2001; Giorgi *et al.*, 2008).

Clima: esta zona se caracteriza por una gran variabilidad climática, con precipitación media anual de 1.050 mm (DE=125 mm), distribuido con un régimen isohigro, el 70% de las lluvias es en primavera-verano, 23% en otoño y sólo el 7% en invierno. La temperatura media anual es de 18,0 °C (DE= 1,0 °C), con el promedio de 26,0 °C y 12,7 °C en los meses de enero y julio, respectivamente, y con una amplitud térmica promedio de 13,3 °C (Panigatti, 1980; Panigatti & Mosconi, 1982).

Aptitud agropecuaria: es heterogénea, pero en las dos regiones (ambos Departamentos) existen extensiones importante de tierras de capacidad productiva alta o media (Giorgi *et al.*, 2008).

Agricultura: las zonas muestreadas son de aptitud heterogénea: mixta, agrícola-ganadera. Los principales cultivos son: soja, trigo y maíz. Se presenta alrededor del 35% de la producción láctea nacional y el 50% de la producción de carne bovina de la provincia (Giorgi *et al.*, 2008).



Fig. iv: Esquema representativo de la zona de estudio perteneciente a la provincia de Santa Fe y algunos de los cultivos estudiados.

#### Muestreo de insectos

El monitoreo de insectos se realizó con frecuencia semanal en cada cultivo, desde la siembra o trasplante hasta la fecha de cosecha, incluyendo así todo el ciclo del cultivo en el estudio. Las metodologías específicas utilizadas para cada sistema de cultivo se detallan en el capítulo correspondiente, dependiendo de que se tratase de cultivos de cereales, hortícolas o de la vegetación aledaña a los cultivos.

### Identificación y determinación de la abundancia de las especies

La cuantificación de áfidos en todos los casos fue realizada *in situ*. Muestras de áfidos sanos y vivos fueron recolectados y transferidos dentro de recipientes plásticos con tapa (150 cm<sup>3</sup>); desde los cuales, submuestras fueron transferidas a tubos Eppendorf de 1.5 cm<sup>3</sup>. Las submuestras fueron preservadas en alcohol al 70% para la futura identificación hasta nivel de especie de acuerdo a las claves de Blackman & Eastop (2000, 2006). Especímenes de referencia fueron depositados en la Colección Entomológica del INTA.

### Análisis estadísticos

Tanto en sistemas extensivos como intensivos, con el fin de evaluar la relación entre la abundancia de la población hospedadora y el porcentaje de infección fúngica, se realizó regresión lineal en logaritmos naturales de ambas variables (número total de áfidos sanos e infectados por fecha de muestreo).

Se utilizó el *Test de Levene* para comprobar si los datos satisfacían o no los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. El test de *Kruskal–Wallis* (análisis de la varianza por rangos) (Siegel, 1956) fue usado para determinar, en cada sitio, si hubo diferencias en la tasa de infección entre las semanas de muestreo (todas las fechas de muestreo fueron incluidas en el análisis) y entre los estados de desarrollo. Cuando fueron detectadas diferencias a  $P < 0.05$ , el Test de *U-Mann–Whitney* fue usado para determinar qué semanas mostraron tales diferencias. Cuando el número de áfidos infectados difirió significativamente entre estadios de desarrollo, se utilizó regresión logística para comparar el riesgo de infección entre los estadios de desarrollo.

En el caso de los cultivos intensivos, para evaluar la influencia de las variables independientes temperatura y humedad relativa en el número de áfidos infectados, se construyó un Modelo Lineal General univariante. La variable respuesta fue el número de áfidos infectados, mientras que las variables independientes introducidas en el modelo fueron temperatura y humedad relativa.

Los análisis fueron realizados usando los programas estadísticos SPSS versión 15.0 e InfoStat (InfoStat, 2004) y SPSS versión 15.0.

Las fotografías incuidas en el manuscrito son originales, es decir fueron tomadas por la autora.

### Datos ambientales

Los datos de temperaturas medias y humedad relativa fueron registrados en cada sitio de estudio para cada día de observación y se detallan en el apéndice (ver páginas 166-174). Los valores correspondientes a la localidad de Rafaela fueron tomados de la Estación Meteorológica ubicada en la Estación Experimental Agropecaria del INTA Rafaela. Mientras que los datos pertenecientes al Departamento La Capital (localidades de Monte Vera y Recreo) fueron obtenidos de la Facultad de Ciencias Hídricas de la Universidad Nacional del Litoral.

A photograph of a brown beetle on a green leaf. The leaf is covered in numerous small, yellowish, star-shaped spots, likely representing entomophthorale fungi. The beetle is positioned in the center of the frame, facing upwards. The background is a soft-focus green, suggesting a natural outdoor setting.

**CAPÍTULO I: Identificación y Aislamiento de  
Hongos Entomophthorales**

## INTRODUCCIÓN

La identificación y taxonomía de los hongos entomophthorales está basada en la descripción de las estructuras fúngicas. Las estructuras cambian durante el ciclo de vida que comienza con la multiplicación del hongo en el hospedador y finaliza con la muerte de todas las estructuras fúngicas originadas desde un hospedador. En un momento determinado del ciclo de vida únicamente un número limitado de las estructuras está presente. Por ello, una preparación microscópica de un hospedador infectado puede mostrar únicamente unas pocas estructuras. Para estudiar todas las estructuras, son necesarias preparaciones seriadas de hospedadores infectados.

En la siguiente tabla se enumeran y describen los caracteres que son considerados para la identificación de las especies (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Caracteres taxonómicos de las estructuras de los hongos Entomophthorales.

<b>Estructura</b>	<b>Caracteres</b>	<b>Observaciones</b>
<b>1. Hospedador vivo</b>		
<b>Protoplastos</b>	- presencia/ausencia - forma - tipo de multiplicación/crecimiento vegetativo - número y tamaño de núcleos	Los protoplastos no tienen una pared celular estable, pero presentan una forma típica. Están ausentes en muchas especies. Algunas veces los núcleos no se tiñen.
<b>Cuerpos hifales</b>	- forma - tipo de multiplicación/crecimiento vegetativo - número y tamaño de núcleos*	*en especies pertenecientes a la Familia Entomophthoraceae los núcleos se tiñen profundamente con orceína.
<b>2. Hospedador moribundo</b>		
<b>Cuerpos hifales</b>	- forma - dimensiones - número y tamaño de núcleos - modo de germinación, diámetro del tubo germinativo.	
<b>3. Hospedador muerto</b>		
<b>Cistidios</b>	- presencia/ausencia - forma - dimensiones*	El diámetro debe ser medido en el nivel de la capa conidial y cercano al ápice.
<b>Rizoides</b>	- presencia/ausencia - monihifal/compuesto	

	- dimensiones - terminaciones - ubicación en el hospedador	
<b>Conidióforos</b>	- simple*/ramificado - naturaleza de la ramificación - diámetro - número, tamaño y distribución de los núcleos	*Especies con conidióforos no ramificados tienen el mismo número de núcleos en los conidióforos y en los conidios primarios.
<b>Conidios primarios</b>	- modo de descarga - pared única o doble - forma - dimensiones - número y tamaño de núcleos* - contenido (vacuolas)	*Núcleos en especies mononucleadas se tiñen bien con orceína. Los núcleos en especies oligo o multinucleadas se tiñen mejor con la reacción Feulgen.
<b>Conidios secundarios</b>	- modo de formación - forma - dimensiones - modo de descarga.	
<b>Conidióforos secundarios</b>	- morfología y dimensión	
<b>Esporas de resistencia</b>	- forma - dimensiones - color - ornamentación - modo de formación (cigosporas, acigosporas) - número de núcleos - pared (estructura, dimensión) - modo de germinación	
<b>Conidios germinales</b>	- modo de formación - forma - modo de descarga - dimensiones	Desconocidos en la mayoría de las especies.
<b>Núcleos</b>	- estructura - tamaño - número por estructura fúngica - distribución en estructuras fúngicas.	La mayoría se tiñen con orceína o la reacción Feulgen.

La identificación taxonómica de los hongos entomophthorales fue realizada teniendo en cuenta los caracteres descritos en la tabla anterior y tomando como base monografías y claves para cada grupo de hongos, entre ellas fueron consideradas las de Bałazy (1993); Humber (1997, 2012b) y Keller (1987, 1991).

La caracterización por técnicas moleculares consiste en el análisis de las isoenzimas o de los ácidos nucleicos, con el fin de estudiar la diversidad genética que existe entre las poblaciones de hongos entomopatógenos (Lecuona, 1996). En las últimas tres décadas se han desarrollado un gran número de diferentes técnicas de genética molecular. Dos invenciones importantes han influido fuertemente en este desarrollo excepcional: la secuenciación automatizada y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A mediados de 1970 fue desarrollado el primer protocolo de secuenciación, lo que ha permitido obtener de forma rutinaria información de secuencia de genes o regiones del genoma (Sanger *et al.*, 1977). La invención de la PCR (Mullis *et al.*, 1986) consiste en la amplificación de secuencias de ADN en presencia de “cebadores” (primers), ADN polimerasas y precursores del ADN (dideoxinucleótidos). El principio de la PCR radica en tres pasos secuenciales que son repetidos entre 25 a 40 veces: el primer paso es la desnaturalización del ADN a 92° - 96° C, seguido de un paso de apareamiento de los “primers” a la simple hebra de ADN realizado a 35° - 65° C y, finalmente, un paso a 72° C en donde ocurre la extensión de la molécula de ADN mediante la incorporación de los precursores (Mullis *et al.*, 1986).

En las investigaciones referentes a hongos, las aplicaciones en biología molecular han adquirido importancia para estudios de ocurrencia natural, ecología, variación intra e interespecífica, genética de poblaciones, identificación de organismos individuales, filogenia como así también estructura y función de los genes.

Las secuencias de ADN<sub>r</sub> que codifican para la formación de ARN ribosómico, son encontrados universalmente en células vivas y se presentan como un “cluster” génico, el cual es repetido en “tandem” centenas de veces. Cada unidad de repetición (“cluster génico”) incluye 3 genes: ADN<sub>r</sub> 18S, ADN<sub>r</sub> 5,8S y ADN<sub>r</sub> 28S, los cuales son separados por dos regiones denominadas “espaciadores transcritos internos” (en inglés, “ITS”).

Los enfoques basados en las PCR pueden ser divididos en *amplificación de loci conocidos*, que representa una amplificación de una sola región característica del ADN del genoma de un organismo, y *amplificación de loci anónimos*, que representa la amplificación de regiones no caracterizadas del genoma de un organismo.

Entre las regiones conocidas del ADN, los genes 18s y 28s presentan regiones altamente conservadas, por ello se diseñaron “primers” universales para la amplificación de la región comprendida entre el ITS1, 5,8s y el ITS2 de cualquier especie fúngica (Driver *et al.*, 2000). Los análisis comparativos de las secuencias de nucleótidos de los genes del ADN ribosomal y los ITS permitieron clarificar las relaciones filogenéticas entre varios hongos entomopatógenos (Bowman *et al.*, 1992; Hibbett, 1992; Bidochka *et al.*, 1999; Driver *et al.*, 2000; Inglis y Tigano, 2006). Otro gen recientemente estudiado es el factor de elongación 1 alfa (EF1- $\alpha$ ).

La técnica de PCR por RFLP ha sido muy utilizada para estudios de Entomophthorales, y se han analizado mediante este enfoque, principalmente la región ITS y el gen 28s del ARN ribosomal. La región ITS es generalmente de evolución más rápida dentro del grupo de genes del ARNr y con frecuencia puede proporcionar resolución a nivel de especie (Bruns *et al.*, 1991; Lanfranco *et al.*, 1998; Takamatsu, 1998). La técnica RFLP de la región ITS como así también del gen 28s del ARNr han sido aplicadas para el grupo de hongos entomophthorales dentro de géneros o complejos de especies, pero también han sido usadas entre poblaciones de la misma especie (Francis *et al.*, 2004; Hajek *et al.*, 2003; Jensen & Eilenberg, 2001; Jensen *et al.*, 2001; Rohel *et al.* 1997; Sierotzki *et al.*, 2000; Thomsen & Jensen, 2002).

El gen nuclear 18s del ARNr ha sido el más comúnmente utilizado como gen blanco para análisis filogenéticos o investigaciones de variación genética. En Entomophthorales ha sido utilizado para estudiar la divergencia evolutiva (Jensen *et al.*, 1998; Nagahama *et al.*, 1995). Estos análisis han apoyado la hipótesis de monofilia y han confirmado la exclusión de *Basidiobolus* de este Orden. Además los análisis de las secuencias obtenidas del gen nuclear 18s del ARNr han permitido la delimitación de diferentes especies de *Neozygites* (Delalibera *et al.*, 2004). La región ITS se ha utilizado en varios estudios para investigar la variación genética entre y dentro de varias especies, por ejemplo para evaluar las diferencias entre *P. neoaphidis* y *Pandora kondoiensis* (Milner) Humber (Tymon *et al.*, 2004).

Cebadores específicos para hongos entomophthorales han sido diseñados para la región ITS II y para el gen 28s del ARN ribosomal (Jensen & Eilenberg, 2001). Estos cebadores fueron exitosamente aplicados para amplificación de secuencias blanco a partir de cadáveres de moscas esporulados como así también desde cadáveres

esporulados almacenados en alcohol. Algunos cebadores específicos han sido desarrollados para las especies *P. neoaphidis* y *P. kondoiensis*, y usados ya sea para áfidos infectados obtenidos de bioensayos en el laboratorio, o para áfidos recolectados desde el campo sin aislamiento o cultivo previo del hongo (Tymon *et al.*, 2004). Esto favoreció la identificación de especies de hongos entomofthorales para las cuales es difícil la obtención de cultivos *in vitro*. Más recientemente, cebadores específicos para *P. neoaphidis* han sido desarrollados y utilizados para detección de estos organismos en muestras de ADN de suelo (Enkerli *et al.*, 2005b). Además otros cebadores específicos fueron diseñados por Thomsen y Jensen (2002) para identificación de esporas de resistencia de *E. muscae*.

Entre las técnicas utilizadas para amplificar regiones desconocidas del ADN se destacan la denominada RAPD por sus siglas en inglés, que significa la amplificación al azar de regiones de ADN polimórfico, la rep-PCR que es la PCR de elementos repetitivos, la AFLP por su sigla en inglés que es la amplificación de fragmentos polimórficos de longitud.

La técnica RAPD es realizada con primers simples de alrededor de 10 pares de bases de longitud. El análisis por RAPD ha sido utilizado para estudiar la variación intraespecífica dentro de los géneros *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Pandora* y *Zoophthora* (Bidochka *et al.*, 1995; Hajek *et al.*, 1996; Hodge *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2001; Rohel *et al.*, 1997; Sierotzki *et al.*, 2000; Tymon & Pell, 2005). Estos estudios se han centrado principalmente en las posibles correlaciones entre los perfiles obtenidos de RAPD y el origen geográfico de los aislamientos o insecto hospedador o en la distinción de las cepas aisladas de las que se han aislado ocurriendo localmente. La herramienta denominada rep-PCR se ha utilizado para investigar la diversidad genética en hongos entomofthorales. Mientras que la técnica AFLP es más confiable para la eficiente detección de polimorfismos. El uso de cebadores largos y específicos hacen que esta técnica sea más robusta y reproducible que las amplificaciones realizadas por RAPD. AFLP es una herramienta ampliamente utilizada para investigar la estructura de una población y la diversidad de animales, plantas y hongos y ha sido aplicada para varios hongos patógenos de insectos, entre ellos, *E. maimaga* (Nielsen *et al.*, 2005).

Los hongos patógenos tienen la ventaja de poder cultivarse *in vitro*. Para crecer y desarrollarse *in vitro*, la mayoría de los Entomophthorales patógenos de insectos necesitan un medio más rico en nutrientes que los clásicos medios sólidos como Sabouraud agar, o agar de papa y dextrosa. La adición de yema de huevo es adecuado en los casos de las especies que pueden crecer como cuerpos hifales en medios sólidos. Sin embargo, varias especies tienen requerimientos nutricionales tan altos que sólo pueden crecer y desarrollarse en medios líquidos complejos. La obtención de cultivos puros se puede hacer directamente mediante la inoculación del medio con las esporas obtenidas del cadáver del hospedador o cuando este mecanismo no es posible, el aislamiento puede intentarse utilizando otros estadios del hongo como cuerpos hifales, protoplastos, o esporas de resistencia.

## OBJETIVOS

- Identificar las especies de hongos morfológicamente
- Identificar las especies de hongos molecularmente.
- Aislar las especies de hongos entomophthorales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Identificación de los hongos Entomophthorales mediante caracteres morfológicos:

Para la identificación de hongos patógenos de áfidos se tuvo en cuenta el estado en el que se encontró el insecto, así se procedió de acuerdo a:

- Áfidos muertos con evidencia de crecimiento fúngico externo (mostrando esporulación) fueron examinados bajo estereomicroscopio y microscopio óptico para verificar la presencia de rizoides, cistidios, y/o esporas.
- Áfidos muertos sin signos externos de micosis fueron colocados en cápsulas de Petri de 60 mm de diámetro con un papel de filtro humedecido con unas gotas de agua destilada estéril (cámara húmeda) y mantenida a 20°C por 24–72 hs para favorecer el desarrollo de la micosis.
- Áfidos vivos con síntomas de aparente infección fueron también transferidos a cámaras húmedas y mantenidos en las mismas condiciones detalladas arriba para facilitar el desarrollo de la infección.

Las estructuras de los hongos fueron montadas en lactofenol-aceto-orceína (LPAO) (1:1) o teñidas con aceto-orceína al 1% más glicerina para preparados semipermanentes. Las preparaciones de hongos fueron fotografiadas utilizando un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara Olympus, modelo DP71.

Los conidios fueron medidos en preparaciones “en fresco”, y observados con microscopio óptico con contraste de fases. Las medidas expresadas de las estructuras fúngicas observadas son los valores promedio  $\pm$  su desviación estándar.

Por otro lado, ejemplares de los insectos hospedadores infectados fueron almacenados en alcohol 96% a 4°C en heladera en tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf para futuros estudios de caracterización molecular de las especies.

#### Identificación de los hongos Entomophthorales mediante técnicas moleculares:

El material fúngico utilizado para la identificación molecular de las especies se mantuvo preservado en alcohol 96% en heladera hasta el momento de su utilización. Para la identificación molecular de las especies de hongos se realizó en primer lugar la extracción de ADN, de acuerdo al protocolo de extracción que se describe a continuación.

#### Protocolo de extracción de ADN mediante la matriz Chelex (BioRad) (Universidad de Copenhagen, Facultad de Ciencias de la Vida, Dinamarca).

Los áfidos infectados fueron preservados en alcohol al 96% hasta el momento de la extracción de ADN. Cada áfido fue tomado con una pinza y fue colocado sobre un papel de filtro limpio para quitarle el excedente de alcohol. Luego de tres minutos aproximadamente, cada áfido fue transferido a un tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml. En ese mismo tubo Eppendorf se agregaron 20  $\mu$ l de buffer fosfato salino (PBS PH 7.2) y 5  $\mu$ l de proteinasa K (concentración: 10mg/ml). La mezcla fue homogeneizada utilizando un DNA free-pestle (previamente esterilizado con baños de alcohol al 96% y secado en papel de filtro) (en este paso, el áfido fue presionado contra la pared del tubo hasta quedar desmenuzado). Las muestras fueron centrifugadas a 10.500 xg por 30 segundos. Luego se agregaron 150  $\mu$ l de la matriz Chelex al 10%.

El siguiente paso involucró la incubación overnight a 56°C. Al día siguiente, las muestras fueron incubadas a 94°C por 15 minutos (los tubos se mantuvieron con las tapas cerradas). Nuevamente las muestras fueron centrifugadas a 10.500 xg por 30 seg. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf. El ADN fue almacenado a -20°C. Previo a la realización de las PCR, fueron realizadas diluciones de las muestras de ADN en concentración 1/10.

*Amplificación y secuenciamiento de tres genes de ADN ribosómico.*

Tres regiones del ADN ribosómico fueron amplificadas por PCR y posteriormente secuenciadas: ITS 1, la región 18S del ADNr y la última parte del gen 28S del ARNr. Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 20 µl, en el cual se colocó 2 µl de la muestra de ADN (previamente diluída), 5 µl de buffer de reacción 5 x (con 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 14,75 µl de H<sub>2</sub>O 1 x, 0,5 µl de una mezcla de dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (10 mM), 1,25 µl de cada primer (10 µM), 0,25 µl de *Taq* polimerasa (2 U/ µl). Los pares de primers utilizados fueron ITS 5 y 5,8s-3' (White et al. 1990) para la amplificación de la región ITS 1, nu-SSU-0021-5' y nu-SSU-1780-3' (Gargas & DePriest 1996) para la región 18 S del ADNr; y LSU 0018-5' y LSU 0805-3' para la amplificación de la última parte del gen 28S del ARNr.

Las condiciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 30 seg. a 98°C, seguida por 38 ciclos con desnaturalización por 10 seg. a 98°C, la temperatura de hibridación varió de acuerdo a la región que se pretendía amplificar siendo a 58°C en el caso de la región SSU, 60°C para la amplificación de la región ITS 1 y 55°C para el caso de la región LSU. En todos los casos la hibridación abarcó 20seg. El ciclo de PCR continuó con una extensión por 1 min. a 72°C y una extensión final por 10 min. a 72°C nuevamente.

El siguiente paso involucró la corrida electroforética de los productos de PCR en geles de agarosa a 150 V por 45 min. En la corrida fue incluido un marcador de peso molecular de 100 pb.

Previamente a la secuenciación, los productos de PCR fueron purificados con un kit de purificación mediante el siguiente protocolo: en primer lugar, dos series de tubos de colecciones fueron rotulados: tubos eppendorfs normales de 1,5 ml y tubos de PCR con los números correspondientes a cada muestra. A continuación fueron adheridos 500

µl del buffer de captura (azul) y < 100 µl del producto de PCR y se mezcló bien con la pipeta. Luego fueron colocados los filtros en los tubos de colecciones y se cortó la tapa a cada uno de ellos. El buffer y el producto de PCR fue recolectado (mezclando la solución mediante el uso de una pipeta automática) en los tubos que contienen los filtros y se centrifugó por un min. a 16.000 xg. Se descartó el líquido y el filtro y el tubo fueron reutilizados. Se agregaron 500 µl del buffer de lavado (amarillo) y se centrifugó por un minuto a 16.000 xg. Nuevos tubos eppendorfs de 1,5 ml fueron rotulados en la tapa y en el lateral del tubo. Los filtros fueron colocados en los tubos eppendorfs y se agregaron 50 µl del buffer gris. Fueron incubados por un min. a temperatura ambiente y centrifugados por 2 min. a 16.000 xg. Los filtros fueron descartados. El producto purificado de PCR fue medido en Nanodrop para cuantificar la concentración de ADN.

Por último, los productos de PCR fueron enviados a Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania) para la secuenciación en ambas direcciones. Los primers utilizados para la secuenciación fueron los mismos que los utilizados en la PCR.

Las secuencias fueron editadas y posteriormente alineadas utilizando los programas Bioedit y Clustal W2 respectivamente. Inferencias filogenéticas fueron realizadas usando los métodos Maximum Likelihood basado en el modelo de Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993) y de Máxima Parsimonia. El programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6) (Tamura *et al.*, 2013) fue utilizado para la construcción de los árboles de filogenia.

#### *Aislamiento de Hongos Entomophthorales*

Las técnicas para la obtención de aislamientos de hongos entomophthorales fueron realizadas bajo condiciones estériles, bajo cámara de flujo laminar y tanto los medios de cultivo como los materiales fueron esterilizados en autoclave tipo Chamberland a 120°C y a 1 atmósfera de presión durante 25 minutos.

Para la obtención de los aislamientos se utilizó el método descendiente de lluvia de conidios (Papierok & Hajek, 1997). Los áfidos infectados fueron colocados sobre un trozo de papel de filtro estéril humedecido y adherido a la tapa de una cápsula de Petri de 60 mm de diámetro. Luego esta tapa fue invertida sobre la base de la misma placa de Petri que contenía SEMA (80% Sabouraud dextrosa agar + 1% de extracto de levadura y 20% de una mezcla de yema de huevo y leche descremada estéril) más 40.000

unidades/ml penicilina G (Merck®, Alemania) y 80.000 unidades/ml de estreptomycin (Parafarm®, Argentina). Este ensamblaje se dejó 12 hs en la oscuridad a  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ . Luego de 12 hs, la tapa de la cápsula de Petri que tenía el áfido infectado adherido, fue reemplazada por una nueva tapa estéril. Todos los aislamientos fueron incubados a  $22 \pm 1^\circ \text{C}$  con un fotoperíodo de 16:8 (L: O).

## RESULTADOS

### Identificación por métodos de taxonomía clásica

Se identificaron tres especies de hongos entomofthorales patógenos de áfidos. La especie *P. neoaphidis* fue el patógeno más importante de áfidos en cultivos hortícolas, habiéndose registrado desde 15 especies de pulgones plaga. La especie fúngica *Z. radicans* fue secundario a *P. neoaphidis* en número de hospedadores afectados, ya que se identificó desde 13 especies de pulgones. Mientras que la especie *E. planchoniana* fue registrada desde tres especies de áfidos y la recientemente incluida en la Clase Neozygitomycetes *N. fresenii* fue registrada como patógena de una especie de áfido (Fig. 1.1).

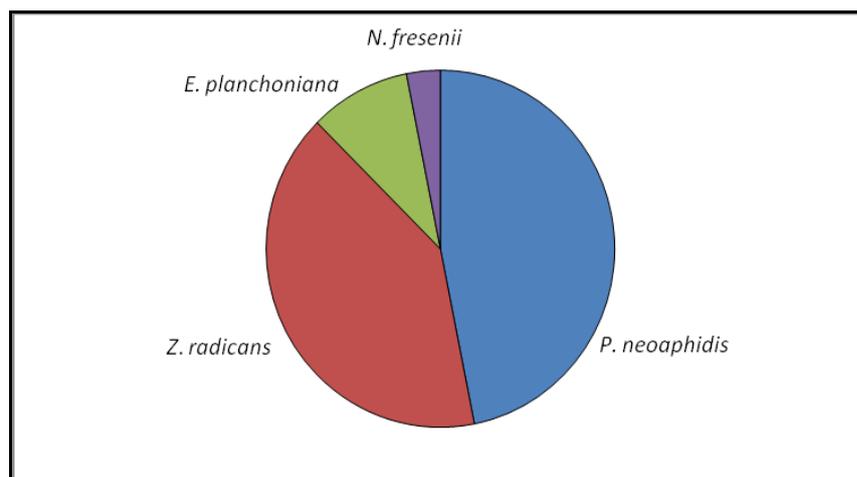


Fig. 1.1. Representación gráfica del número de especies de áfidos afectados por especie fúngica.

A continuación se describe la ubicación y descripción taxonómica de cada una de las especies fúngicas y se detallan las especies de áfidos que infectaron y sobre qué cultivos fue registrada cada especie.

Phylum: Entomophthoromycota

Clase: Entomophthoromycetes

Orden: Entomophthorales

Familia: Entomophthoraceae

Subfamilia: Entomophthoroideae

Género: *Pandora*

Especie: *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber.

*Erynia neoaphidis* Remaudière & Hennebert, Mycotaxon, 11: 307, 1980.

### Descripción taxonómica

Conidios primarios ovoides u ovoides alargados:  $23.55 \pm 2.07$  (19.6 – 27,3) x  $12.08 \pm 1.55$  (9.6 – 14.3)  $\mu\text{m}$ , papila generalmente cónica conectada suavemente con el cuerpo del conidio, redondeado. Conidios secundarios esféricos o en forma de campana:  $17.33 \pm 1.36$  (15.2 – 20.1) x  $13.37 \pm 1.26$  (11.16 – 15.32)  $\mu\text{m}$ . Capiliconidios ausentes. Rizoides con disco adhesivo discoide o irregularmente ramificado. Cistidios presentes. No se observaron esporas de resistencia.

Se registró desde *S. graminum*, *Rhopalosiphum rufiabdominalis* (Sasaki), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch.), *Rhopalosiphum padi* L., *Sitobion avenae* (Fab.), *A. gossypii*, *Aphis* sp., *M. persicae*, *Myzus* sp., *N. ribisnigri*, *Hypermyzus carduellinus* (Theobald), *B. brassicae*, *Uroleucon sonchii* L., *Cryptomyzus korschelti* Börner, *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe, en cultivos de *L. sativa*, *T. aestivum*, *Avena sativa* L., *S. melongena*, *C. annuum*, *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. (coliflor), *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck (brócoli), *Brassica rapa* L., *Anoda cristata* L., *Capsella bursa-pastoris* L., *Sonchus oleraceus* L., *Lamium amplexicaule* L., *Morrenia brachystephana* Griseb y en *Malva sylvestris* L.

Los cadáveres de los áfidos infectados con *P. neoaphidis* presentaron un color, en general, claro (Fig. 1.2). Esta característica dependió en gran parte del color del pulgón hospedador. Los cadáveres se registraron sujetos al sustrato por rizoides simples, generalmente emergiendo del abdomen del áfido.

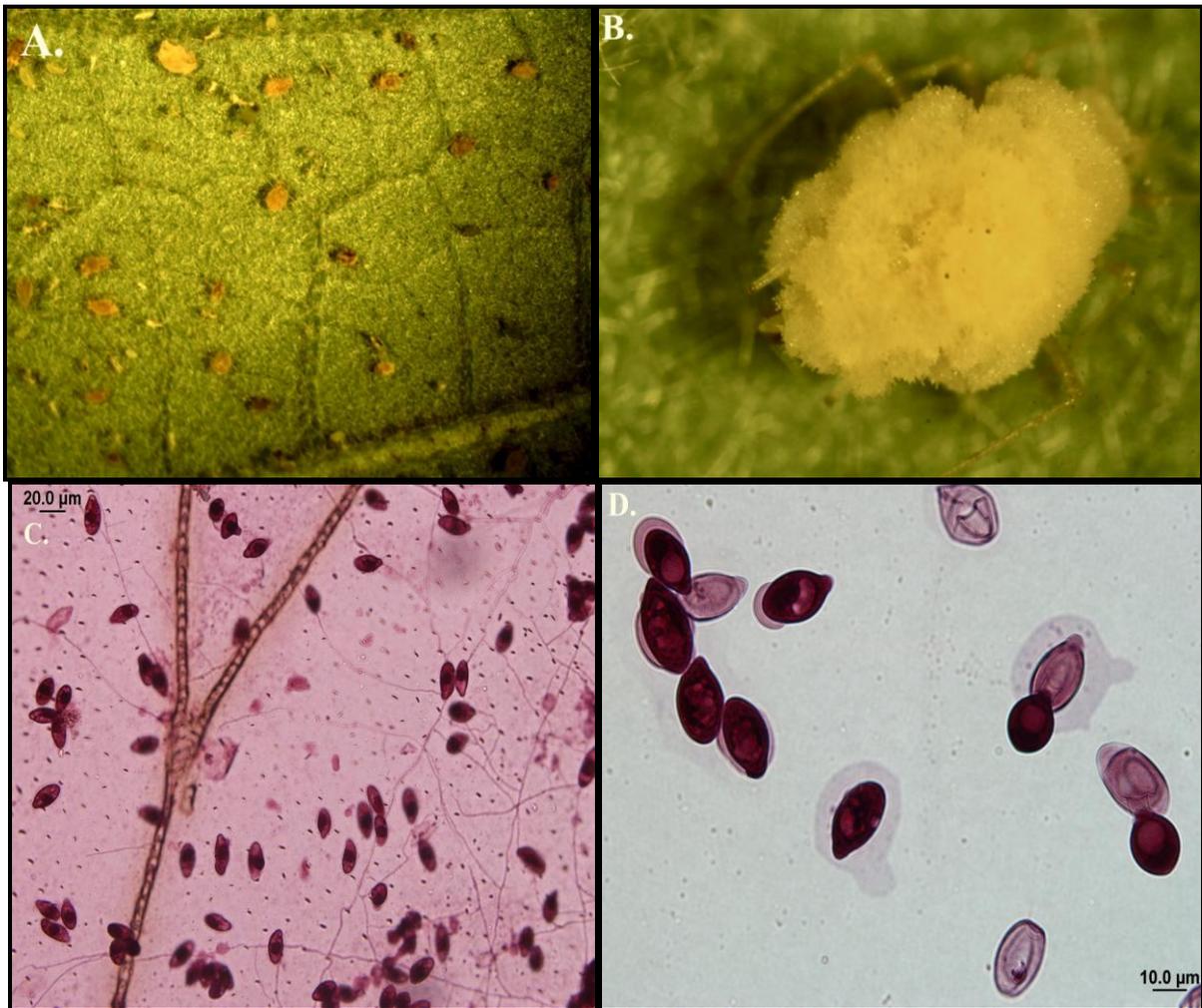


Fig. 1.2: A. Epizootia de *P. neoaphidis* en *M. persicae* sobre *S. melongena*. B. Detalle de adulto áptero de *M. persicae* infectado con *P. neoaphidis*. C. Conidios primarios de *P. neoaphidis* sobre un ala de *M. persicae*. D. Detalle de conidios primarios y conidios secundarios emergiendo de estos.

Phylum: Entomophthoromycota

Clase: Entomophthoromycetes

Orden: Entomophthorales

Familia: Entomophthoraceae

Género: *Zoophthora*

Especie: *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko

*Empusa radicans* Brefeld, Bot. Zeitg. 28: 161-166, 1870.

#### Descripción taxonómica

Conidios primarios alargados, papila generalmente cónica demarcada con una ligera protuberancia desde el cuerpo del conidio:  $22.63 \pm 3.40$  ( $16.36 - 25.94$ ) x  $8.14 \pm 0.75$  ( $7.39 - 9.67$ )  $\mu\text{m}$ . Conidios secundarios como capiliconidios:  $20.04 \pm 1.83$  ( $18.89 - 24.4$ ) x  $7.09 \pm 0.54$  ( $6.39 - 7.93$ ) x  $46.95 \pm 9.70$  ( $35.81 - 60.31$ )  $\mu\text{m}$ . (Fig. 1.3). Rizoides delgados, compuestos con disco adhesivo especializado. No se observaron esporas de resistencia.

Fue registrada causando infecciones en las especies de áfidos *S. avenae*, *S. graminum*, *R. maidis*, *R. padi*, *Sipha maydis* Passerini, *R. rufiabdominalis*, *M. persicae*, *Myzus* sp., *B. brassicae*, *C. korschelti*, *H. carduellinus*, *Dysaphis apiifolia* (Theobald) y *Aphis* sp. sobre *T. aestivum*, *A. sativa*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *B. oleracea* var. *italica*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *L. amplexicaule*, *M. sylvestris*, *S. oleraceus*, *Foeniculum vulgare* Miller y *C. bursa-pastoris*.

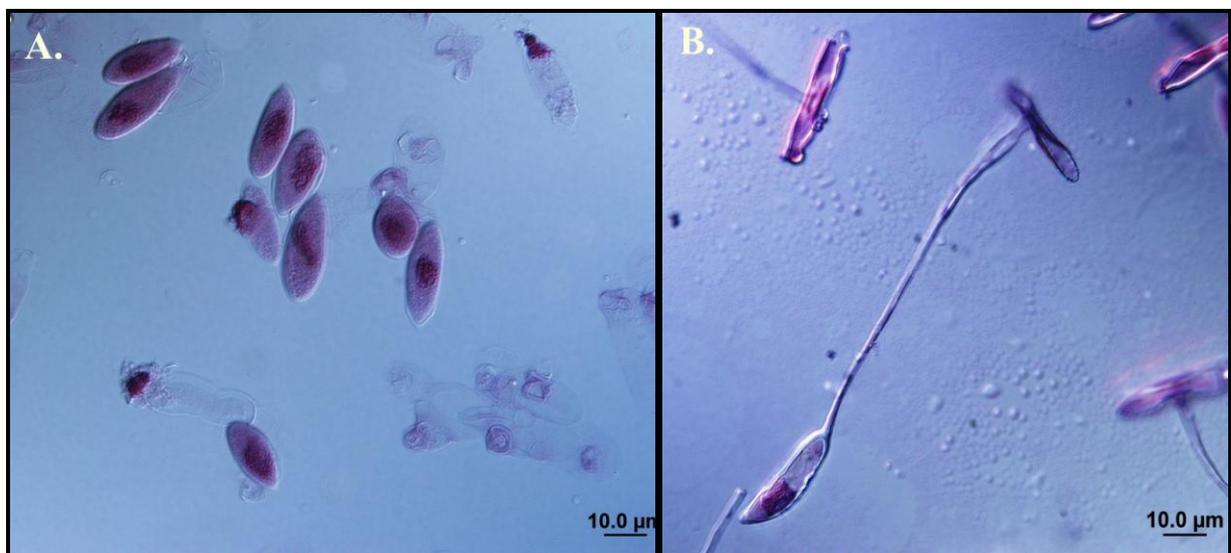


Fig. 1.3: A. Conidios primarios y B. Capiliconidio de *Z. radicans*.

Phylum: Entomophthoromycota

Clase: Entomophthoromycetes

Orden: Entomophthorales

Familia: Entomophthoraceae

Género: *Entomophthora*

Especie: *Entomophthora planchoniana* Cornu

### Descripción taxonómica

Conidios primarios esféricos, multinucleados (de 3 a 5 núcleos):  $14.2 \pm 2.5$  ( $12,1 - 16,8$ ) x  $12,1 \pm 2,3$  ( $9,8 - 14,5$ )  $\mu\text{m}$ . Los conidios secundarios se observaron emergiendo de los conidios primarios y fueron levemente más pequeños que los primarios:  $11.2 \pm 1,72$  ( $9,7 - 13,5$ ) x  $10,5 \pm 1,5$  ( $8,7 - 12,2$ )  $\mu\text{m}$ . No se observaron esporas de resistencia ni cistidios.

La especie *E.planchoniana* fue identificada a partir de *M. persicae*, *N. ribisnigri* y *C. korschelti* sobre *B. oleracea* var. *capitata*, *C. annuum*, *L. sativa*, *S. melongena* y *L. amplexicaule*. Los cadáveres de los áfidos infectados con *E. planchoniana* presentaron un color rojizo, y se hallaron adheridos al sustrato por medio de rizoides (Fig. 1.4).

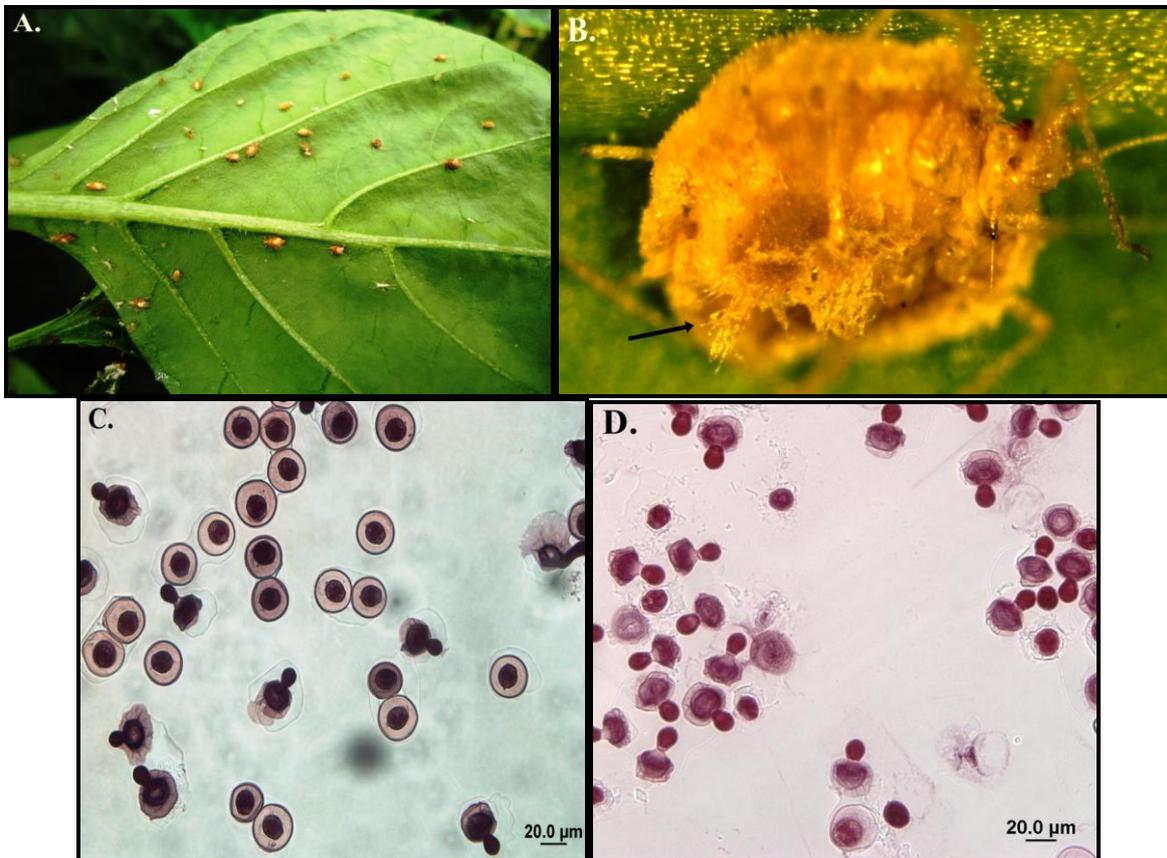


Fig. 1.4: A. Epizootia de *E. planchoniana* en *M. persicae* sobre *C. annuum*. B. Detalle de rizoides emergiendo del abdomen de *M. persicae*. C. Conidios primarios y D. Conidios secundarios emergiendo de los primarios de *E. planchoniana*.

Phylum: Entomophthoromycota

Clase: Neozygitomycetes

Orden: Neozygitales

Familia: Neozygitaceae

Género: *Neozygites*

Especie: *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Remaudière & Keller

*Empusa fresenii* Nowakowski, Pamitn. Wydz. Akad. Umiej. W. Krakow 8: 171-172, 1883.

### Descripción taxonómica

Conidios primarios subesféricos a ovoides cortos con la base más o menos plana:  $16,86 \pm 1,10$  ( $14,88 - 17,36$ ) x  $10,91 \pm 1,35$  ( $9,92 - 12,4$ )  $\mu\text{m}$ . Usualmente con 4 núcleos. Conidios secundarios similares a los primarios, levemente más pequeños o capiliconidios. No se observaron esporas de resistencia. Cistidios y rizoides ausentes en esta especie.

Esta especie se registró infectando únicamente a *S. graminum* en cultivo de *Sorghum bicolor* (L.) (Fig. 1.5).

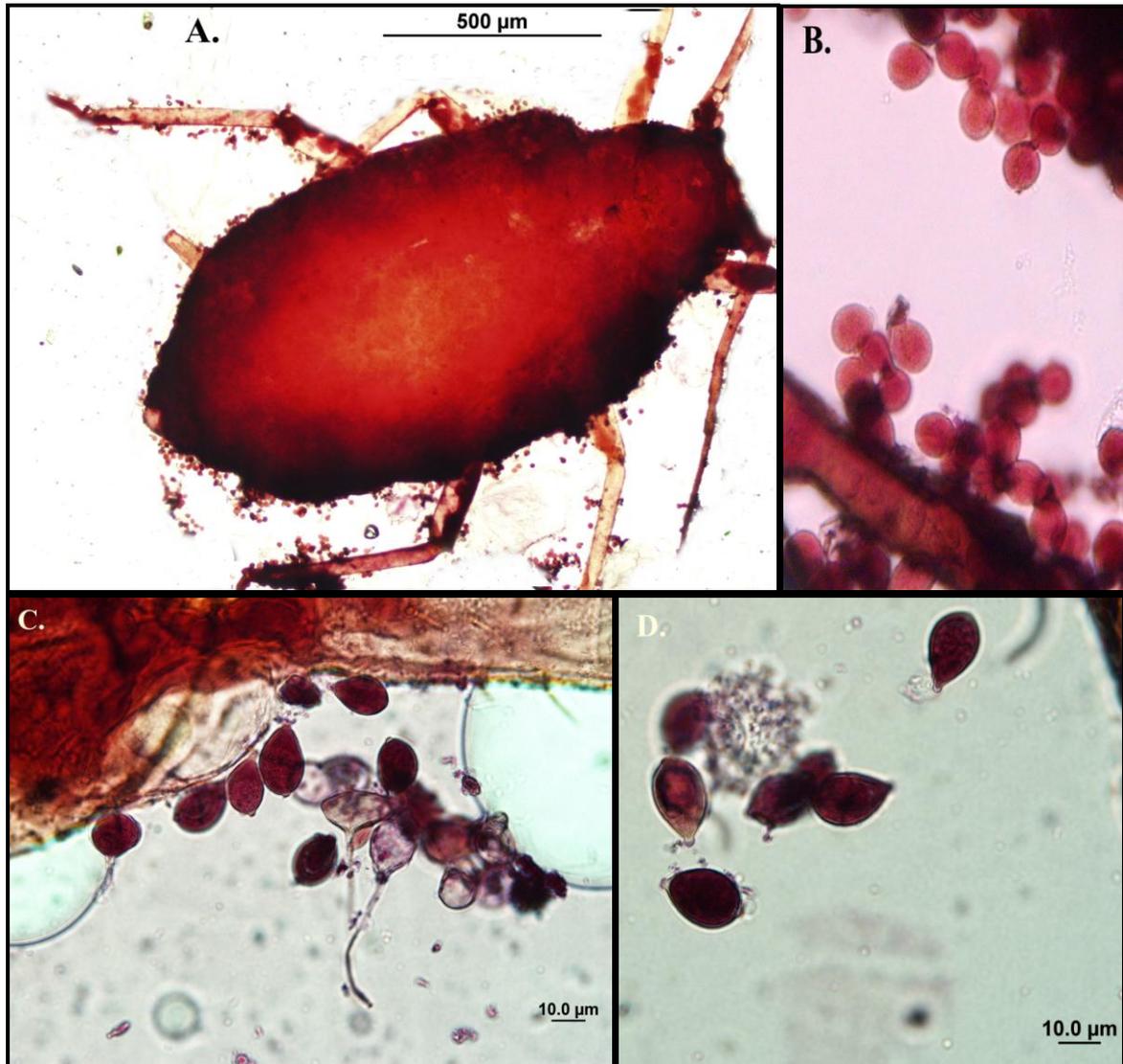


Fig. 1.5: A. adultos áptero de *S. graminum* infectado con *N. fresenii*. B. Conidios primarios de *N. fresenii*. C-D. Conidios secundarios de *N. fresenii*, algunos como capiliconidios.

Si bien las medidas de las estructuras de cada una de las especies permitió confirmar las especies registradas, se decidió confirmar la identidad de las mismas mediante la utilización de técnicas moleculares.

#### Identificación por técnicas moleculares

Las amplificaciones de las tres regiones del ADNr se muestran en las figuras 1.6. Los perfiles electroforéticos evidenciaron fragmentos de ADN de distinta longitud. De acuerdo a los resultados de la secuenciación, la región comprendida entre los primers LSU 0018-5' y LSU 0805-3' fue la de mejor calidad y por lo tanto fue la utilizada para

la construcción del árbol filogenético. De las seis muestras que fueron sometidas al proceso de secuenciación, cuatro resultaron en secuencias probables de ser analizadas (Tabla 1.2).

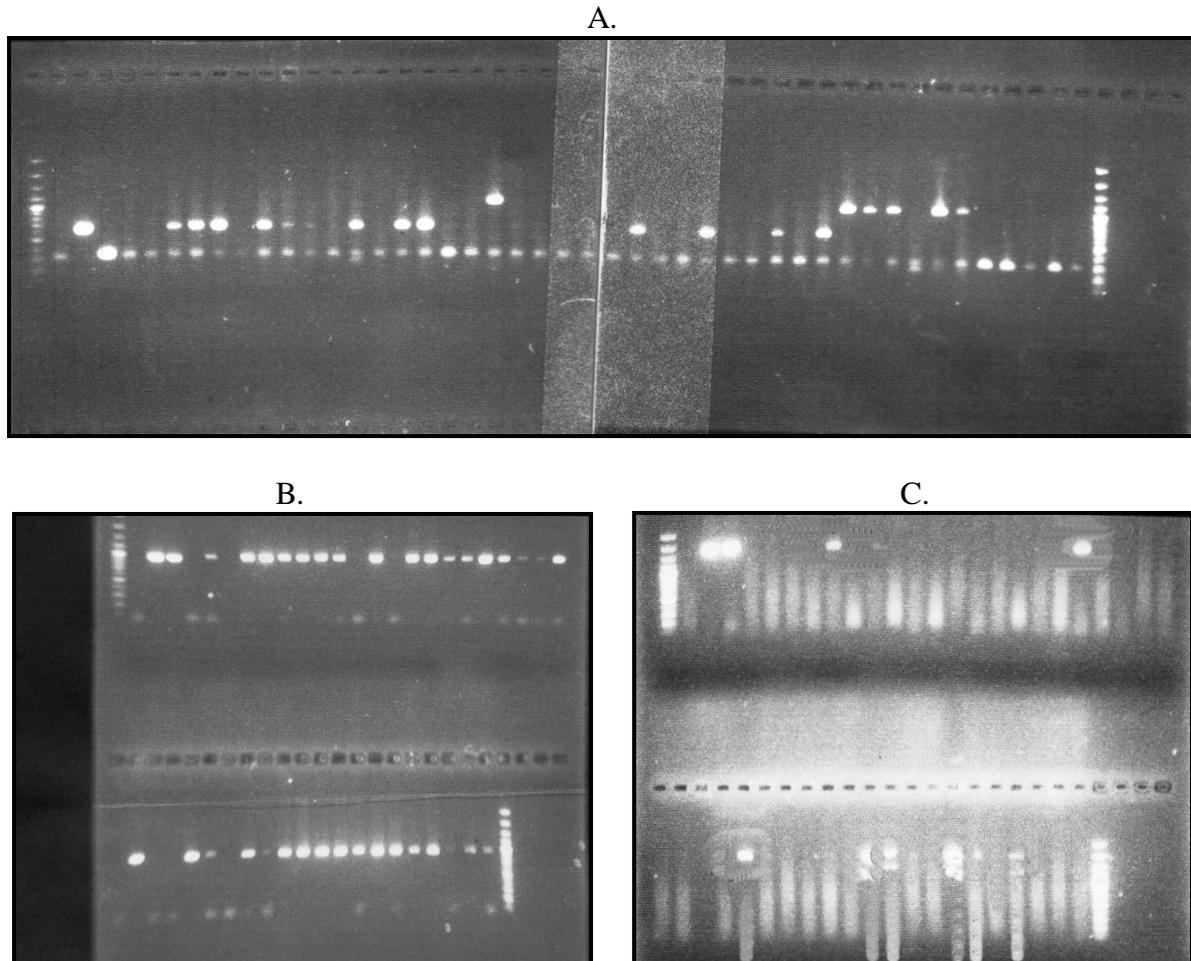


Fig. 1.6: Perfiles electroforéticos obtenidos de la amplificación realizada con los primers ITS 5 y 5,8s-3' (A), LSU 0018-5' y LSU 0805-3' (B) y SSU 0021-5' y 1780-3' (C).

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo con aquellas secuencias que están depositadas en el GeneBank (NCBI) (Tabla 1.2) permitió la obtención de los árboles de filogenia que se muestran en la Fig. 1.7.

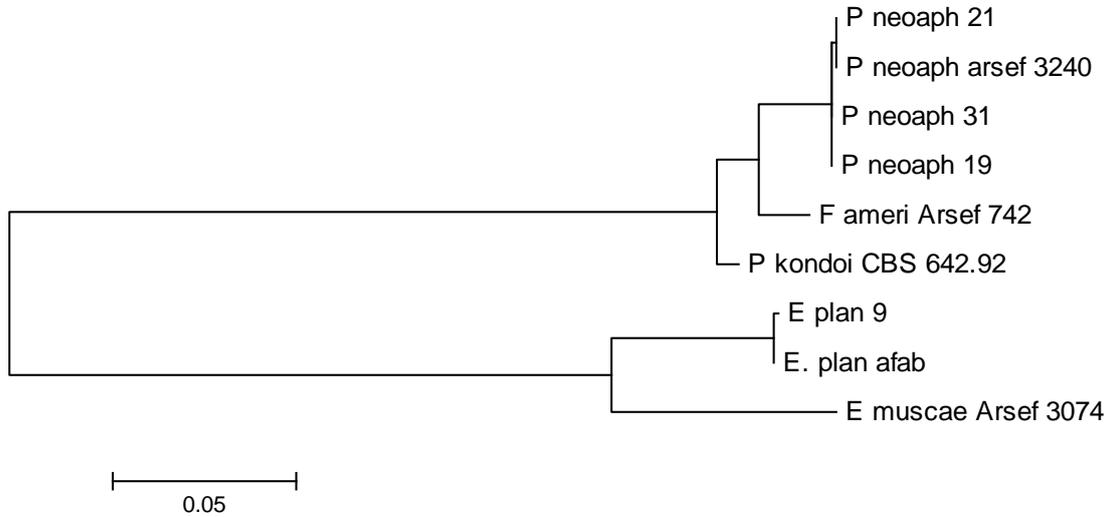
Tabla 1.2: Información de las secuencias utilizadas para la construcción del árbol de filogenia.

<b>Especie fúngica</b>	<b>Denominación</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Nº de acceso al GeneBank</b>
<i>P. neoaphidis</i> 19	<i>P. neoaph</i> 19	<i>M. persicae</i>	-
<i>P. neoaphidis</i> 21	<i>P. neoaph</i> 21	<i>N. ribisnigri</i>	-
<i>P. neoaphidis</i> 31	<i>P. neoaph</i> 31	<i>R. rufiabdominalis</i>	-
<i>P. neoapahidis</i>	Arsef 3240	-	EF392405.1
<i>P. kondoiensis</i>	<i>P. kondoi</i> CBS 642.92	-	JX242603.1
<i>F. americana</i>	<i>F. ameri</i> Arsef 742	-	EF392389.1
<i>E. planchoniana</i> 9	<i>E. plan</i> 9	<i>M. persicae</i>	-
<i>E. planchoniana</i>	<i>E. plan.</i> Afab	-	GQ285877.1
<i>E. muscae</i>	<i>E. muscae</i> Arsef 3074	-	NG_027647.1

El mismo resultado fue obtenido con los diferentes métodos utilizados para la construcción de los árboles de filogenia (maximum likelihood y máxima parsimonia). De la interpretación de los mismos, se desprende que las especies de *Pandora* sp. y de *Entomophthora* sp. están reunidas en dos grupos claramente diferenciados. Las secuencias pertenecientes a la especie *Pandora* sp. incluidas en el análisis se muestran agrupadas evidenciándose en ambos árboles que la secuencia perteneciente al hospedador 21 es la más cercana a la cepa ARSEF 3240 de referencia. A su vez, la interpretación de los árboles demuestra que las secuencias pertenecientes a *P. neoaphidis* se encuentran más cercanas filogenéticamente a *Furia americana* (ARSEF 742) que a *P. kondoiensis* CBS 642.92. Por otro lado la secuencia de *E. planchoniana* obtenida en este estudio se encontró agrupada a la secuencia de *E. planchoniana* afab obtenida del GeneBank. Y por último en ambos árboles fue claramente visible la

cercanía de *E. muscae* (ARSEF 3074) a las secuencias de *E. planchoniana* aunque no se han agrupado.

**A.**



**B.**

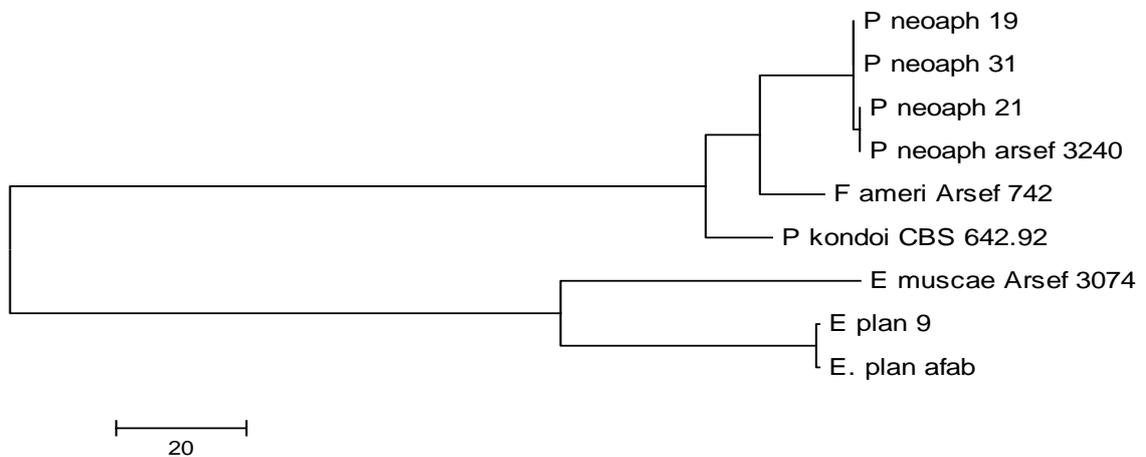


Fig. 1.7: Árbol filogenético construido a partir de la última parte de la región 28s del ADNr que fue amplificada y secuenciada desde áfidos infectados y secuencias obtenidas del GeneBank (NBCI). Se muestran la identidad y relaciones entre las especies. Los métodos utilizados para la construcción de los árboles fueron Maximum likelihood (A) y Máxima parsimonia (B). Las distancias representan el número de sustituciones por sitio en el primer árbol y el número de cambios en toda la secuencia en el árbol de máxima parsimonia.

### Aislamiento de hongos entomophthorales

Se lograron obtener aislamientos de las especies *P. neoaphidis* y *Z. radicans* en medios de cultivo SEMA (Fig. 1.8). Estos se encuentran depositados en las colecciones micológicas del CEPAVE y de ARSEF. En la Tabla 1.3 se detalla la información correspondiente a cada uno de los aislamientos obtenidos. No fue posible la obtención de cultivos *in vitro* de las especies fúngicas *E. planchoniana* y *N. fresenii*. El material de herbario se encuentra depositado en la Colección Micológica del CEPAVE.



Fig. 1.8: Aislamiento de *P. neoaphidis* (izquierda) y de *Z. radicans* (derecha) obtenidos en medio de cultivo SEMA.

Tabla 1.3: Listado de cepas obtenidas en medio de cultivo SEMA.

Nº cultivo	Especie fúngica	Sp. de áfido	Planta Hospedadora	Fecha de colecta	Localidad	Nº de acceso a colecciones
1	<i>Zoophthora radicans</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>M. sativa</i>	10-06-12	Monte Vera (Santa Fe)	CEP 362 ARSEF 11859
2	<i>Zoophthora radicans</i>	<i>Nasonovia ribisnigri</i>	<i>L. sativa</i>	31-07-12	Pereyra (Buenos Aires)	CEP 363 ARSEF 11860
3	<i>Pandora neoaphidis</i>	<i>Nasonovia ribisnigri</i>	<i>L. sativa</i>	18-06-12	Pereyra (Buenos Aires)	CEP 364 ARSEF 11862
4	<i>Pandora neoaphidis</i>	<i>Nasonovia ribisnigri</i>	<i>L. sativa</i>	03-07-12	Abasto (Buenos Aires)	CEP 365 ARSEF 11863
5	<i>Zoophthora radicans</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	27-05-12	Monte Vera (Santa Fe)	CEP 366 ARSEF 11861

## DISCUSIÓN

Estudios taxonómicos previos del Orden Entomophthorales fueron llevados a cabo en Argentina por López Lastra y Scorsetti (2006) quienes citan las medidas de las estructuras fúngicas observadas en su estudio. En este trabajo fue observado que, en general, las medidas de las estructuras fueron coincidentes con las de las claves utilizadas para la comparación y con las medidas citadas por estudios previos. De esta manera fue posible la confirmación de la identidad de las especies *P. neoaphidis*, *Z. radicans*, *N. fresenii* y de *E. planchoniana* por métodos de taxonomía clásica.

Sin embargo, para complementar la identificación de las especies, fueron realizados análisis mediante técnicas moleculares. En Argentina son escasos y aislados los estudios de identificación mediante técnicas moleculares. Jensen *et al.* (2009) con el objetivo de analizar la divergencia entre especies de *Entomophthora* sp. patógenos de áfidos y de mosca doméstica, amplificaron tres regiones de ADN, entre ellas la ITS I y la LSU del ARNr. Si bien estos estudios fueron realizados en Dinamarca, se incluyeron en el trabajo ejemplares provenientes de Argentina. Scorsetti *et al.* (2011) aplicaron técnicas de identificación molecular para detectar la presencia de esporas de resistencia de *P. neoaphidis* en *N. ribisnigri* en cultivos de lechuga en Buenos Aires. En este estudio aplicaron las regiones ITS II y la región SSU del ARNr. La amplificación de la región ITS del ADNr es comúnmente utilizada para la diferenciación de especies de Entomophthorales. Tymon *et al.* (2004) han identificado y establecido relaciones entre *P. neoaphidis*, *P. kondoiensis* y *Z. radicans* mediante la amplificación y análisis de la región ITS2 del ADNr. Asimismo los mismos autores estudiaron la variación genética entre aislamientos de *P. neoaphidis* mediante la amplificación de regiones ITS.

En este estudio, fue posible la identificación y confirmación de las especies *P. neoaphidis* y de *E. planchoniana* mediante el análisis de las secuencias correspondientes a la parte final del gen 28s del ADNr. Los resultados obtenidos permiten verificar que las técnicas de biología molecular empleadas han sido las adecuadas para la confirmación de la identidad de las especies. Sin embargo, estudios futuros son necesarios para establecer comparaciones y relaciones entre las especies de hongos patógenos de áfidos. La calidad de las secuencias correspondientes a *Z. radicans* y a *N. fresenii* no permitió el análisis de las mismas.

A nivel mundial, si bien las técnicas moleculares son ampliamente utilizadas para establecer relaciones filogenéticas y clarificar el origen de los grupos, la identificación de las especies pertenecientes al grupo de hongos Entomophthorales mediante taxonomía clásica sigue siendo muy utilizada.

La obtención de cultivos *in vitro* de *P. neoaphidis* y de *Z. radicans* confirmó la hipótesis de que algunas especies de hongos entomophthorales pueden ser aisladas de sus hospedadores originales en medios de cultivos artificiales. En el caso de las especies fúngicas *N. fresenii* y *E. planchoniana*, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos suponer que estas especies tienen requerimientos nutricionales muy elevados lo que dificulta el aislamiento de las cepas. En un estudio de revisión llevado a cabo por López Lastra y Scorsetti en el año 2007, los autores destacan 12 especies de hongos entomophthorales citadas desde distintos insectos hospedadores en Argentina y señalan, que de las 12, únicamente han sido aisladas en cultivos anéxicos las especies *P. neoaphidis* y *Z. radicans*, lo que es coincidente con lo obtenido en la presente tesis.

## CONCLUSIONES

- Dentro del Phylum Entomophthoromycota, fueron identificadas tres especies pertenecientes al Orden Entomophthorales y una especie ubicada recientemente en el Orden Neozygitales como patógenas de especies de áfidos.
- Las especies fueron identificadas mediante técnicas de taxonomía clásica y en el caso de *P. neoaphidis* y *E. planchoniana* la identificación fue corroborada por técnicas de biología molecular.
- Las técnicas de biología molecular utilizadas para la identificación de las especies posibilitaron la construcción de un árbol de filogenia mediante el cual se visualizó la relación entre las especies de hongos.
- Se obtuvieron aislamientos de dos especies de Hongos Entomophthorales, confirmando la hipótesis de que algunas especies pueden ser cultivadas *in vitro*.



## **CAPÍTULO II: Hongos Entomophthorales patógenos de áfidos en Cereales<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Resultados parciales de este Capítulo fueron publicados en “Annals of Applied Biology”. Ver Manfrino et al. 2014a.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En la Argentina, la superficie sembrada del total de granos y algodón creció de 28885000 has en la campaña 2003/04 a 36954000 has 2012/13. En tanto que la producción del total de granos aumentó de 69783000 tn a 105456700 tn entre las campañas 2003/04 y 2012/13. Los cereales representan actualmente el 48,5% del total de la producción nacional de granos, mientras que los cultivos de oleaginosas representan el 49.8% y los incluidos en “otros cultivos” el 1.57% (MAGyP). Entre los cereales, el maíz representa el 63% del total de la producción del país, seguido por el trigo con 16% de la producción total, luego le siguen la cebada cervecera con el 10%, el sorgo granífero con el 7%, arroz 3%, avena 1%, y en menor proporción el centeno, alpiste, cebada forrajera y mijo que no llegan al 1% del total de la producción nacional.

El trigo constituye un alimento básico para el hombre. Además gran parte se destina a la alimentación animal, así como a subproductos de la transformación industrial destinado para piensos. El trigo se cultiva en todo el mundo siendo la principal área de cultivo la zona templada del hemisferio norte. En la Argentina la principal área productora de trigo es la región pampeana. Según fuentes del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, la cosecha de este cereal se ubicaría en los 9.2 millones de toneladas, un 11% más que el ciclo pasado. <http://www.pregonagropecuario.com/cat.php?txt=4987#HkuobQybs7Ks2h3F.99>

Entre los cereales secundarios se incluyen el maíz, el sorgo, la cebada, el centeno, la avena, el mijo. La avena (*A. sativa*) es el verdeo de invierno de mayor difusión en el país. Se destaca por su tolerancia al estrés hídrico y la elevada tasa de crecimiento inicial. Además, se caracteriza por mantener su calidad en estadios reproductivos. Se la utiliza con doble propósito (grano y forraje), reserva de forraje y grano como suplemento animal. El sorgo es un cultivo de verano perteneciente a la familia de las gramíneas y al género *Sorghum*. Es el quinto cereal en importancia a nivel mundial detrás del maíz, el trigo, el arroz y la cebada aportando el 3% de la producción total. Las características agronómicas particulares del sorgo han llevado a un aumento del área en los últimos años. Es un cultivo que se puede incluir en las rotaciones resultando beneficioso para el suelo y con bajo costo en relación al maíz, además puede ser un buen reemplazante de éste en la dieta nutritiva, sobre todo en períodos de sequía

debido a que es más eficiente en la utilización del agua. En la Argentina, la producción de sorgo se concentra en la región pampeana, siendo las zonas de Santa Fe y Córdoba las que mejores aptitudes tienen para la siembra. El cultivo presenta bajos costos de implantación lo que le permite competir en rentabilidad con cultivos anuales como el maíz y la soja.

Los usos del sorgo son múltiples y dependen de su genética, se puede utilizar para consumo humano y para la alimentación animal; así mismo también posee propiedades como insumo para la producción de papel, adhesivos, refinamiento de minerales y elaboración de embutidos, entre otros usos industriales. En nuestro país, la demanda de sorgo se compone esencialmente de la molienda para alimentación y de la exportación. Los que demandan para molienda son principalmente firmas dedicadas a la producción ganadera y lechera, mientras que las ventas externas se componen principalmente de grandes traders internacionales (Dragún *et al.*, 2010).

El consumo de cereales secundarios ha crecido rápidamente, impulsado sobre todo por el uso creciente como piensos en los países en desarrollo. En el futuro, su consumo puede crecer con mayor rapidez que el del arroz o el trigo, en línea con el crecimiento del sector pecuario. Los países en desarrollo representarán una proporción en aumento de la producción mundial, pasando desde menos de la mitad en la actualidad hasta casi tres quintas partes en 2030.

Los cereales, desde la siembra hasta la cosecha, se hayan expuestos a múltiples adversidades. Estas son de distinto carácter: climático (granizo, sequía e inundaciones), plagas (insectos, crustáceos), enfermedades (fúngicas, bacterianas y virósicas) y malezas. Dentro de las plagas, los pulgones o áfidos constituyen el principal problema en todas las regiones de producción cerealera del país.

Más de 165 especies de áfidos en el mundo han sido identificadas en cultivos de cereales (Blackman & Eastop, 2000). En Argentina, las especies de áfidos observadas atacando trigo y cereales forrajeros son: el “pulgón verde de los cereales” *S. graminum*; el “pulgón amarillo de los cereales” *Metopolophium dirhodum* (Walker); el “pulgón de la espiga” *S. avenae*; el “pulgón del maíz o de la cebada” *R. maidis*; el “pulgón de la avena” *R. padi*; el “pulgón de la raíz” *R. rufiabdominalis*; el “pulgón ruso del trigo” *D. noxia*; el “pulgón negro de los cereales” *S. (Rungia) maidis*; y *Geoica lucifuga*

(Zehntner, 1897) (Imwinkelried *et al*, 2004; Saini, 2005). Botto & Hernández (1989) destacaron el impacto económico de estas especies durante la producción de cultivos en Argentina.

*Schizaphis graminum* se detectó en nuestro país a principios del siglo XX, pero fue declarado plaga de la agricultura a partir de 1937, por los daños que originaba en los cereales. *Metopolophium dirhodum* fue observado en la Argentina en el año 1968; mientras que *Sitobion avenae* se registró en el año 1971. *Rhopalosiphum maidis* fue citado por primera vez en nuestro país, por Blanchard, en el año 1923; mientras que *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, fue en el año 1978, en la provincia de Santa Fe. *Diuraphis noxia* se detectó en la Argentina, en el año 1991, en la provincia de Mendoza. *Sipha* (Rungia) *maidis* es de aparición más reciente detectándose en el año 2002, en Córdoba, Mendoza y Entre Ríos. *Geoica lucifuga* fue el último en registrarse, en el año 2003, en el sudoeste de provincia de Buenos Aires (Imwinkelried *et al.*, 2004; Ves Losada y Leguizamón, 2004).

#### Características de las especies de pulgones plagas de cereales

*Sipha maidis* se reproduce por partenogénesis telitóquica por viviparidad. Las colonias de estos áfidos se ubican en la parte superior (cara adaxial) de las hojas, en la inserción de éstas con el tallo. En altas densidades debido a una gran infestación, suelen observarse en ambas caras de la hoja. En las etapas reproductivas de los cultivos (estado de grano lechoso a madurez) sus colonias se concentran en la hoja bandera y en las hojas inferiores en menor densidad. Ataca gramíneas silvestres y cultivadas, entre ellos los cereales, pasturas naturales e implantadas. Se lo ha observado en: avena (*A. sativa*), avena negra (*Avena fatua*), agropiro (*Agropiron* sp.), cebada (*H. vulgare*), cebadilla (*Bromus unioloides*), *Bromus catharticus*, centeno (*Secale cereale*), festuca (*Festuca* sp.), gramilla (*Cynodon dactylon*), maíz (*Zea mays*), poa (*Poa* sp.), raygrás (*Lolium* sp.), sorgo de Alepo (*Sorghum alepensis*) y trigo (*T. aestivum*). Provocan daños directos e indirectos. Esta especie es transmisora del virus del mosaico del pepino (CMV, siglas en inglés) y del enanismo amarillo de la cebada (BYDV, siglas en inglés) en gramíneas. Su distribución abarca las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Mendoza, La Pampa, Entre Ríos.

*Diuraphis noxia* se reproduce por partenogénesis telitóquica por viviparidad, pasando el invierno como ninfa o hembra adulta. No se conocen biotipos de este áfido. En la Argentina se lo ha observado en: avena (*A. sativa*), cebadilla (*B. uniolooides*), *Hordeum comosum*, cebada cervecera (*Hordeum distichum*), *Hordeum murinum*, *Hordeum secalicum*, cebada (*H. vulgare*), centeno (*S. cereale*) y trigo (*T. aestivum*). Esta especie puede atacar durante todo el ciclo de cultivo, desde el macollaje hasta antes de la cosecha. Las colonias de este pulgón se ubican con preferencia en la parte superior de las plantas. Las plantas atacadas se detectan por el daño en sus hojas y en las espigas. Con temperaturas de templadas a cálidas, las hojas atacadas, presentan un estriado longitudinal característico de color blanquecino a blanco-amarillento provocado por la inoculación de una toxina que inyectan al alimentarse. Con bajas temperaturas, en épocas frías estas estrías son de color rojizo a púrpura, debido a la presencia de pigmentos antociánicos. Las hojas superiores se enrollan longitudinalmente formando una especie de “tubo” dentro de la cual se localizan las colonias de áfidos y de esta forma se protegen. Esta particular disposición disminuye la acción de los insecticidas de contacto dificultando su control. Este áfido prefiere las hojas jóvenes, pero en la medida que la población aumenta es posible observarlo en los tallos y las espigas. En fuertes infestaciones, las plantas atacadas disminuyen el crecimiento, se enanizan y algunas veces se vuelcan. Asimismo, las espigas en formación se retuercen y no emergen correctamente. Algunas veces, suelen encontrarse grandes colonias resguardadas dentro de la hoja, matando la espiga, mientras que el resto de la caña está verde. El daño de este áfido en el campo se presenta en forma de manchones, con plantas menos desarrolladas y descoloridas, recordando este síntoma al producido por problemas de sequía. Es necesario detectar en forma temprana el ataque de este insecto para evitar importantes pérdidas en el cultivo. Su observación se hace difícil debido al hábito de esconderse en las hojas enrolladas de la planta. Por esa razón, se deben buscar las colonias de áfidos en la base de las hojas, en las láminas de las hojas enrolladas y en los ejes dentro de la vaina de la hoja bandera que acompaña la espiga; no olvidando los síntomas de estriado. Posteriormente al estado de grano pastoso este pulgón no produce más daño. Este pulgón aumenta su población en primavera secas. En el trigo, el ataque comienza a manifestarse a partir de septiembre, llegando a etapa de mayor ataque desde el inicio hasta la plena espigazón (de principios a mediados de noviembre). Se distribuye por Mendoza, Neuquén, Buenos Aires.

*Geoica lucifuga* se reproduce por partenogénesis telitóquica por viviparidad, es decir hembras que paren hembras. Ataca al trigo (*Triticum aestivum*), raigrás anual (*Lolium multiflorum*) y maíz (*Z. mays*), *Bromus* sp., cebadilla criolla (*B. unioloides*) y Poaceae. Además que se ha observado en varias especies de gramíneas, incluyendo el arroz, caña de azúcar, gramón, centenillo y paja voladora. Se ubican en los primeros centímetros de suelo en las raíces de las plantas. Provoca un menor desarrollo en las plantas y disminución de la coloración. La presencia y el aumento de la población podría deberse a una falta de la remoción de los suelos. Ataca por manchones y se encuentra asociado con la presencia de hormigas. Su distribución abarca Buenos Aires, Misiones, Tucumán, Mendoza, Chubut.

*Rhopalosiphum maidis*, se comporta como una especie partenogenética telitóquica por viviparidad, pasando el invierno como ninfa o hembra adulta. Se lo encuentra en avena (*A. sativa*), *Avena* sp, caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), maíz (*Z. mays*), cebada (*H. vulgare*), cebada cervecera (*H. distichum*), *Hordeum* sp., centeno (*S. cereale*), sorgo de Alepo (*S. halepense*), *Sorghum sudanense*, *Sorghum vulgare*, *Sorghum perenne*, *Sorghum* sp., trigo (*T. aestivum*), *Triticum* sp., *Oryza*, *Echinochloa crusgalli*, *Eragrostis* sp., *Poaceae*, y *Cenchrus* sp. Produce daños directos debidos a la extracción de savia, e indirectos por la inoculación de saliva tóxica y ser transmisor del virus del enanismo de la cebada (BYDV). Los mayores daños lo produce sobre el maíz; y en los verdeos invernales, en los meses de febrero, marzo y abril. Ataca en la emergencia y el macollaje. Estos áfidos excretan una sustancia azucarada (melaza), que pone pegajosas a las hojas, sobre la que se desarrolla la fumagina causada por un hongo saprófago. Se distribuye en Buenos Aires, Córdoba, Chubut, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, Mendoza, Santa Cruz, Santa Fe, San Juan, San Luis, Salta, Tucumán.

*Rhopalosiphum rufiabdominalis* es anholocíclica sobre gramíneas, manteniendo su carácter radicícola (Nafria *et al.*, 1994). En la Argentina se reproduce por partenogénesis telitóquica por viviparidad, sobre gramíneas. Forma colonias subterráneas en las raíces y base de las plantas. Se observa en: *avena* sp., trigo, cereales forrajeros, arroz (*Oryza sativa*), *Poaceae*, *Scirpus californicus* y *Cyperus rotundus*. Producen sobre los cereales que atacan daños directos e indirectos, debido a la inoculación de saliva tóxica. Esta citada como una especie transmisora del virus del

enanismo amarillo de la cebada (BYDV). Su distribución abarca Buenos Aires, Córdoba, Misiones, Santa Fe, Tucumán.

*Rhopalosiphum padi* especie dioica holocíclica entre *Prunus padus* (hospedero primario) y gramíneas, o anholocíclico sobre Gramíneas (Nafria *et al.*, 1994). En Argentina se reproduce partenogénicamente y en forma vivípara telitóquica. Se observa en avena (*A. sativa*), cebadilla criolla (*B. unioloides*), pasto ovillo (*Dactylis glomerata*), *Eragrostis* sp., centeno (*S. cereale*), *H. murinum*; cebada (*H. vulgare*), trigo (*T. aestivum*); *Triticum* spp. y maíz (*Z. mays*). Este pulgón se ubica en la parte aérea de la planta, próximo a los macollos o también a nivel del suelo. Se lo ha registrado en otoño, invierno y primavera. Los mayores daños lo producen sobre verdeos invernales, en los meses de febrero, marzo y abril. También ataca al trigo en la emergencia y el macollaje. Produce daños directos debido a las picaduras que realiza para su alimentación, provocando disminución del crecimiento de la planta debido a la succión de savia y la inyección de saliva fitotóxica. También provoca daños indirectos debido a una disminución de la capacidad fotosintética de las hojas por el desarrollo de fumagina (hongos saprófagos) sobre las sustancias secretadas por el áfido, pero por sobre todo porque tiene la capacidad de ser vector de virus. Algunos autores indican que este áfido es vector del BYDV que produce la enfermedad denominada “enanismo amarillo de los cereales” y también es vector del PVY. Se distribuye en Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa, Santa Fe, Tucumán, Mendoza.

*Schizaphis graminum* es monoica holocíclica sobre gramíneas, aunque puede mantenerse anholocíclicamente (Nafria *et al.*, 1994). En Argentina se comporta como una especie partenogénica telitóquica y vivípara, pasando el invierno como ninfa o hembra adulta. Se lo ha observado en: avena (*A. sativa*), *Avena* sp., cebada forrajera (*H. vulgare*), *Hordeum stenostachys*, alpiste (*Phalaris canariensis*), centeno (*S. cereale*), *Sorghum splendidum*, trigo (*T. aestivum*), *Festuca pratensis*, maíz (*Z. mays*), cebadilla criolla (*Bromus unioloides*), *Sorghum* sp., *Sorghum splendidum*, *S. vulgare* (Fig. 2.1), *Dactylis* sp, *Euchlaena mexicana* y *Poaceae*. Producen marchitamiento y otros efectos fitotóxicos. Producen daños directos por la extracción de savia al alimentarse de las hojas de las plantas que ataca e indirectos por inocular fuertes toxinas y virus. El mayor daño lo produce su saliva toxicogénica. Las hojas de las plantas atacadas se tornan cloróticas (se amarillean). Las hojas atacadas se observan con pequeñas manchas con el

centro castaño, que es donde clavó el aparato picor suctor, con un halo amarillento producto de sus toxinas, si el ataque es intenso estas manchas terminan uniéndose y las plantas finalmente se secan y mueren. Ataca en otoño a los verdes y luego pasa al trigo. En el trigo lo hace, desde el nacimiento hasta el encañado de las plantas. Luego pasa al sorgo y maíz como huésped regular del verano. Este pulgón es vector del virus del BYDV, siendo la enfermedad más común y de distribución más amplia en cereales y pastos del mundo. En el trigo, ataca desde la emergencia hasta la encañazón, pero los mayores daños los ocasiona en las primeras dos a tres semanas de emergido el cultivo, al estado de plántula, llegando a producir la pérdida total del cultivo ante fuertes ataques. Debido a esta razón se utilizan insecticidas sistémicos en el tratamiento de las semillas. Su distribución abarca Buenos Aires, Córdoba, Chaco, Entre Ríos, Mendoza, La Pampa, Río Negro, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán.

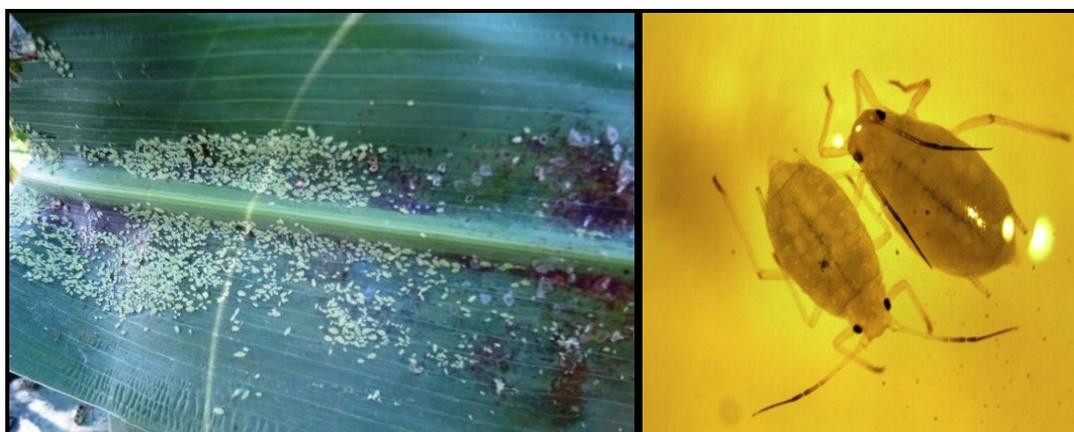


Fig. 2.1: Colonia de *S. graminum* en el envés de una hoja de cultivo de *S. bicolor* (derecha) y ninfas de *S. graminum* vistas en lupa (10 x) (izquierda).

*Metopolophium dirhodum* es una especie dioica holocíclica entre Rosa y gramíneas, en las que puede mantenerse anholocíclicamente (Nafria *et al.*, 1994). En Argentina se comporta como una especie partenogénica telitóquica y vivípara, pasando el invierno como ninfa o hembra adulta. Produce daños directo debido a su alimentación e indirecto por ser vector del BYDV. Inicia sus ataques en las hojas inferiores; luego pasa a las superiores, y de allí a veces a la espiga. Ataca en primavera (desde mediados de septiembre a mediados de noviembre), desde la encañazón hasta la espigazón. Los daños que provoca debido a su alimentación es un amarillamiento en las hojas y disminución del crecimiento. Ante altas densidades poblacionales, produce disminución

en el rendimiento debido a la reducción del número de granos por espiga. Se observa en *Aegilops*, avena (*A. sativa*), *Bromus* sp., cebadilla criolla (*B. unioloides*), pasto ovillo (*D. glomerata*), *H. murinum*, cebada (*H. vulgare*), lino (*L. multiflorum*), *Phalaris* sp., *Phalaris tuberosa* var. *stenoptera*, Poaceae, centeno (*S. cereale*), trigo (*T. aestivum*), *Triticum* sp. Su distribución abarca Buenos Aires, Córdoba, Mendoza, La Pampa, Tucumán, Neuquén, Jujuy.

*Sitobion avenae* es una especie monoica anholocíclica en gramíneas (Nafría *et al.*, 1994). En nuestro país se reproduce por partenogénesis telitóquica por viviparidad, pasando el invierno como ninfa o hembra adulta en gramíneas. Se lo ha observado en: avena (*A. sativa*), cebada (*H. vulgare*), cebadilla (*B. unioloides*), pasto ovillo (*D. glomerata*), centeno (*S. cereale*), Poaceae, trigo (*T. aestivum*) y *Triticum* sp. Producen sobre los cereales daños directos e indirectos. Este pulgón ataca preferentemente en primavera, al estado fenológico fin de macollaje, encañazón y espigazón. En macollaje y encañazón se alimenta de los tallos y hojas, encontrándose en baja densidad. Aparece en trigo a principios de octubre, pero recién se incrementa la población en la etapa de formación del grano (desde fines de octubre hasta principios de noviembre). La espigazón es el período crítico para los cultivos, pues es en este estado donde se produce el llenado de los granos. Se ubican en la raquilla de las espigas dificultando el arribo de los nutrientes al grano, provocando como consecuencia disminución en el rendimiento. Esta especie es transmisora del BYDV en gramíneas. Se distribuye en Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Mendoza, Jujuy, La Pampa, Entre Ríos.

Las poblaciones de pulgones están influidas por un complejo de variables climáticas (Lecuona y Frutos, 1983). Las precipitaciones disminuyen las poblaciones de algunas especies de pulgones (Beirne, 1970; Ves Losada *et al.*, 1977; Lecuona y Frutos, 1983) mientras que años con clima seco las incrementan (Lecuona y Frutos, 1983; Aragón, 1997), haciendo necesario en muchos casos la aplicación de medidas de control.

El criterio de decisión para el manejo de pulgones mediante control químico debe contemplar el umbral económico específico de cada especie y el estado fenológico del cultivo (Tabla 2.1). Además, de observarse cuidadosamente la presencia de enemigos naturales, ya sean depredadores, parasitoides o patógenos.

Tabla 2.1: Umbrales de acción o de control para las diferentes especies de pulgones en cereales.

Especie	Estado del cultivo	Umbral de control	Observaciones
<i>S. graminum</i>	Desde la emergencia hasta 15 días	3-5 pulgones/planta	Realizar control cuando se estimen más de 10 pulgones en 30 cm lineales medidos en la línea de siembra. Repetir la operación realizando el muestreo sobre 50 medidas.
	<i>S. maidis</i>		
	<i>R. padi</i>		
<i>R. maidis</i>	Después de los 15 días de la emergencia	10-15 pulgones/planta	
<i>M. dirhodum</i>	Macollaje	10 pulgones/planta	
	Encañazón	15-20 pulgones/tallo	
	<i>S. maidis</i>	Hola bandera y espigazón	
<i>S. avenae</i>	Espigazón y floración	5 pulgones/espiga	
	Grano acuoso	15-20 pulgones/espiga	
<i>D. noxia</i>	Desde la emergencia hasta las 3 semanas	10% de plantas atacadas	
	Macollaje	10 a 20% de las plantas atacadas o 10 pulgones/macollo	
	Encañazón en adelante	5 al 10% de las plantas atacadas	

En Argentina, el único registro previo de tales hongos infectando hemípteros en cultivos de cereales corresponde a *Pandora* sp. (Entomophthoraceae) y a *Conidiobolus coronatus* (Costantin) Batko (Ancylistaceae) en *Oliarus dimidiatus* Berg. (Hemiptera:

Fulgoromorpha: Cixiidae), sobre cultivo de arroz (Toledo *et al.*, 2008) en La Plata, provincia de Buenos Aires. La mayoría de los registros existentes corresponden a especies de hongos como patógenos de estadios inmaduros de lepidópteros en cultivos extensivos, principalmente soja. *Entomophthora* sp. fue identificado como patógeno de *Rachiplusia nu* en Buenos Aires (Fresa, 1979). *P. gammae* fue registrada infectando a *R. nu* en Santa Fe (Diez y Gamundi, 1985), a *R. nu* y a *Anticarsia gemmatalis* en Buenos Aires (López Lastra y Scorsetti, 2006), y a organismos pertenecientes a *Plusiinae* spp. en Córdoba y en Rafaela (Santa Fe) (Eldestein y Lecuona, 2003).

## OBJETIVOS

- Relevar los hongos patógenos de áfidos en cultivos de trigo, avena y sorgo en Santa Fe.
- Identificar las especies de hongos patógenos.
- Determinar la prevalencia de las infecciones fúngicas en cada uno de los cultivos y en cada uno de los sitios.
- Investigar la relación entre el nivel de infección fúngica y la densidad de la población hospedadora.
- Comparar el número de áfidos infectados entre los estadios de desarrollo del hospedador.
- Observar los datos de temperatura y humedad relativa en relación a la prevalencia de las infecciones fúngicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los cultivos muestreados en este trabajo incluyeron *Triticum aestivum* L. var. Klein Guerrero (trigo), *Avena sativa* L. var. Calen (avena) y *Sorghum bicolor* (L.) Moench var. ADV 114 (sorgo) (Fig. 2.2). Las áreas muestreadas no superaron un área de 500 m<sup>2</sup> por sitio. No fueron aplicados insecticidas o fungicidas en las partes de los cultivos donde fueron realizadas las recolecciones durante el curso del estudio. Seis sitios fueron muestreados (Tabla 2.1) a través de todo el periodo del cultivo.

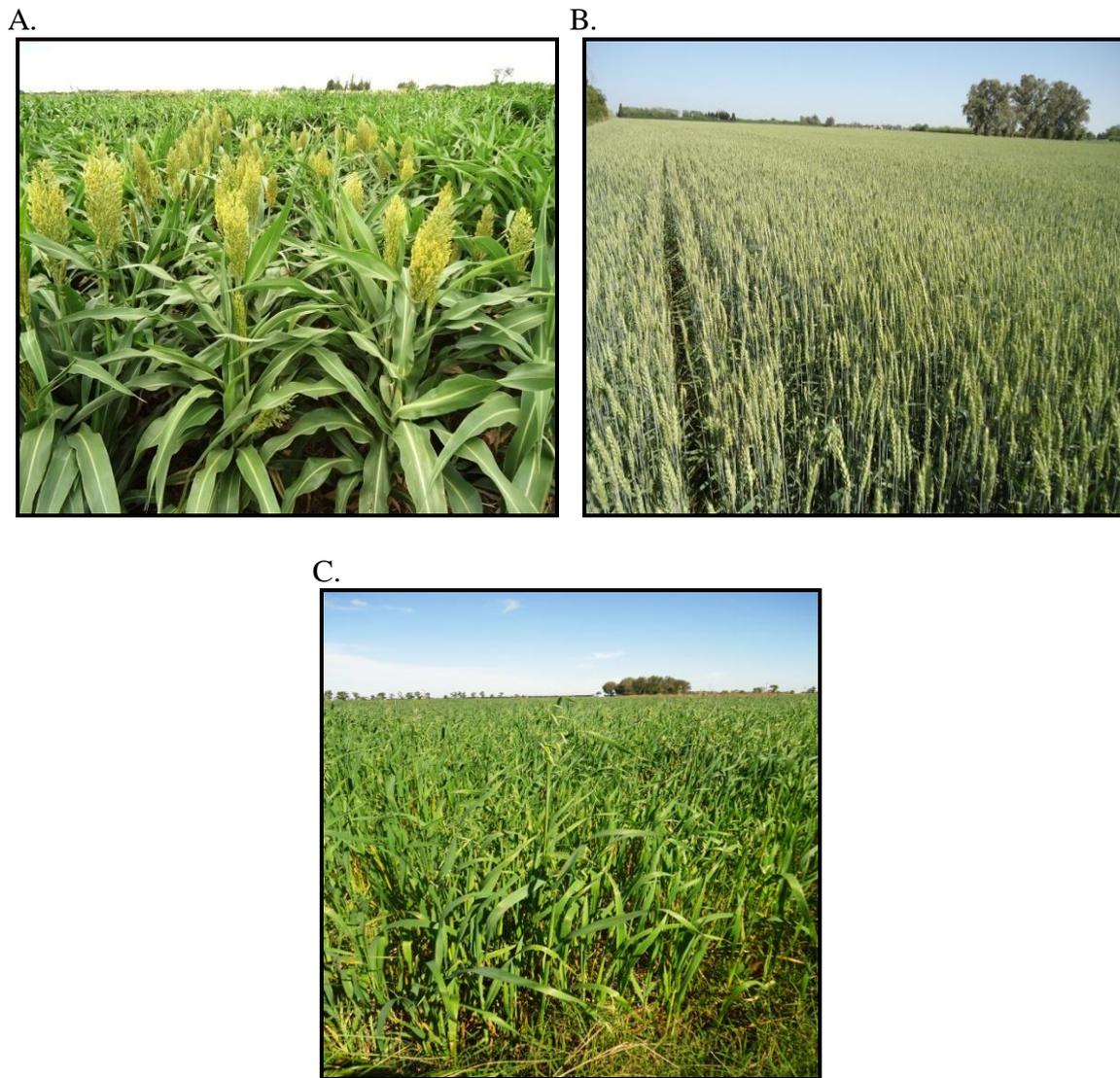


Fig. 2.2: Cultivos muestreados. A: cultivo de *S. bicolor* en estado de floración. B: cultivo de *T. aestivum* en estado de espigazón. C: cultivo de *A. sativa* en estado de panoja.

Tabla 2.1: Descripción de los sitios de estudio

Sitio	Cultivo	Localidad	Latitud S	Longitud O
1	Trigo	Monte Vera	31°32'49.79''	60°41'33.89''
2	Avena	Rafaela	31°11'10.16''	61°30'19.09''
3	Trigo	Rafaela	31°11'16.02''	61°30'20.40''
4	Trigo	Rafaela	31°11'59.32''	61°29'59.29''
5	Sorgo	Rafaela	31°12'6.62''	61°30'11.14''
6	Avena	Rafaela	31°11'32.64''	61°30'3.90''

### Muestreo de áfidos

Los muestreos de los áfidos fueron realizados semanalmente desde el mes de abril del 2010 hasta noviembre del año 2011. El muestreo se llevó a cabo desde la siembra hasta la cosecha y se extendió por 11, 7, 6, 13, 10 y 12 fechas de muestreo en los sitios 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente. En cada fecha de muestreo, un macollo fue examinado en cada uno de 10 puntos equidistantes (separados por 1 m) a lo largo de cinco transectas paralelas (separadas 10 m) dentro del cultivo, totalizando 50 macollos por sitio (Fig. 2.3). Las transectas no fueron permanentemente marcadas y las distancias fueron medidas por pasos. Todos los áfidos en los macollos fueron cuantificados. La cuantificación fue realizada *in situ*. Para la identificación futura de las especies de áfidos, áfidos vivos y sanos fueron recolectados y transferidos dentro de vasos de plástico con tapa (150 cm<sup>3</sup>) desde donde submuestras fueron transferidas a tubos de microcentrífuga (Eppendorf; 1.5 cm<sup>3</sup>), y fueron preservadas en alcohol al 70%. La identificación hasta nivel de especie fue realizada en base a las claves de Blackman & Eastop (2000).

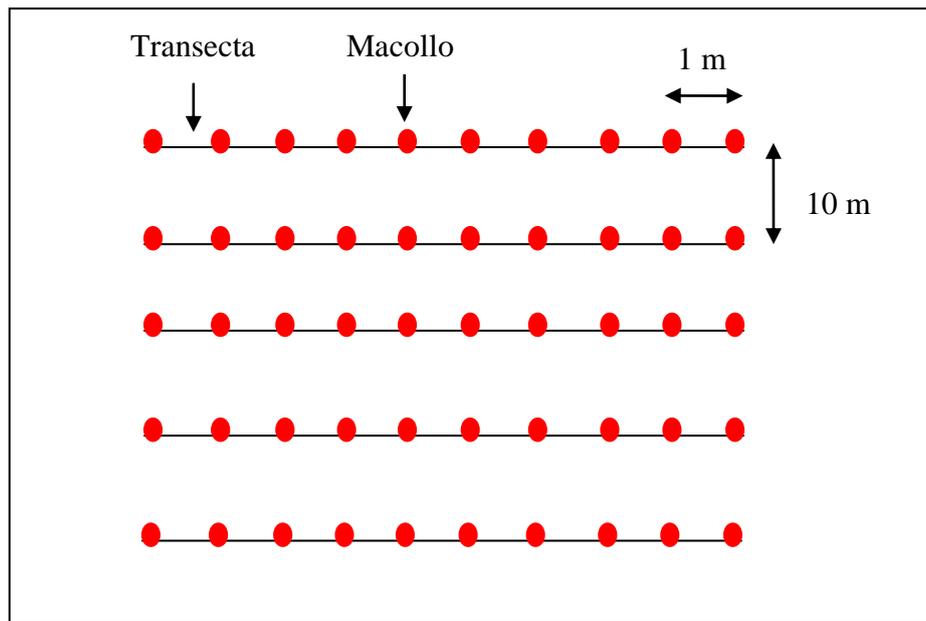


Fig. 2.3: Diagrama representativo del diseño de muestreo utilizado en cultivos de cereales.

## RESULTADOS

### Identificación de hongos patógenos de áfidos

Siete especies de áfidos fueron identificadas desde cultivos de cereales (Tabla 2.3), de las cuales, seis fueron encontradas con infecciones de hongos entomophthorales. Estos áfidos comprenden *Sch. graminum*, *Sipha maydis* Passerini, *Sit. avenae*, *R. maidis*, *R. padi* y *R. rufiabdominalis*. Tres especies de hongos entomophthorales fueron identificadas desde estos áfidos, pertenecientes a las familias Neozygitaceae, *N. fresenii* y Entomophthoraceae, *P.* y *Z. radicans* (Fig. 2.4). Preparados microscópicos permanentes y material seco preservado fueron depositados en la Colección Micológica de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE. Además, muestras fueron almacenadas a 4°C en alcohol al 96% para estudios moleculares (ver Capítulo I).

Tabla 2.3: Número de áfidos por especies (porcentaje de la población total entre paréntesis) y número total de áfidos sanos e infectados por cada sitio de muestreo.

Sitio	Especie de áfido							Áfidos totales	
	<i>Sch. Graminum</i>	<i>R. padi</i>	<i>R. rufiabdominalis</i>	<i>R. maidis</i>	<i>M. dirhodum</i>	<i>Sit. avenae</i>	<i>Sip. maydis</i>	Sanos	Infectados
<b>1</b>	32 (4.0)	4 (0.5)	3 (0.3)	0 (0.0)	89 (10.6)	599 (72.9)	93 (11.2)	641	179 (21.8)*
<b>2</b>	920 (55.9)	57 (3.5)	9 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	659 (40.5)	1626	19 (1.2)*
<b>3</b>	1704 (29.4)	265 (4.6)	236 (4.1)	3100 (53.5)	0 (0.0)	75 (1.3)	416 (7.2)	5451	345 (6.0)*
<b>4</b>	8 (3.1)	0 (0.0)	11 (4.3)	11 (4.3)	71 (27.4)	118 (45.6)	40 (15.4)	253	6 (2.3)*
<b>5</b>	20349 (93.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1532 (7.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	21708	173 (0.007)*
<b>6</b>	90 (15.3)	11 (1.9)	352 (59.9)	0 (0.0)	55 (9.4)	34 (5.8)	46 (7.8)	561	27 (4.8)*
<b>Total</b>	23103	337	611	4643	215	826	1254	30240	749

\* Porcentaje de infección entre paréntesis (número de infectados / número total de áfidos x 100).

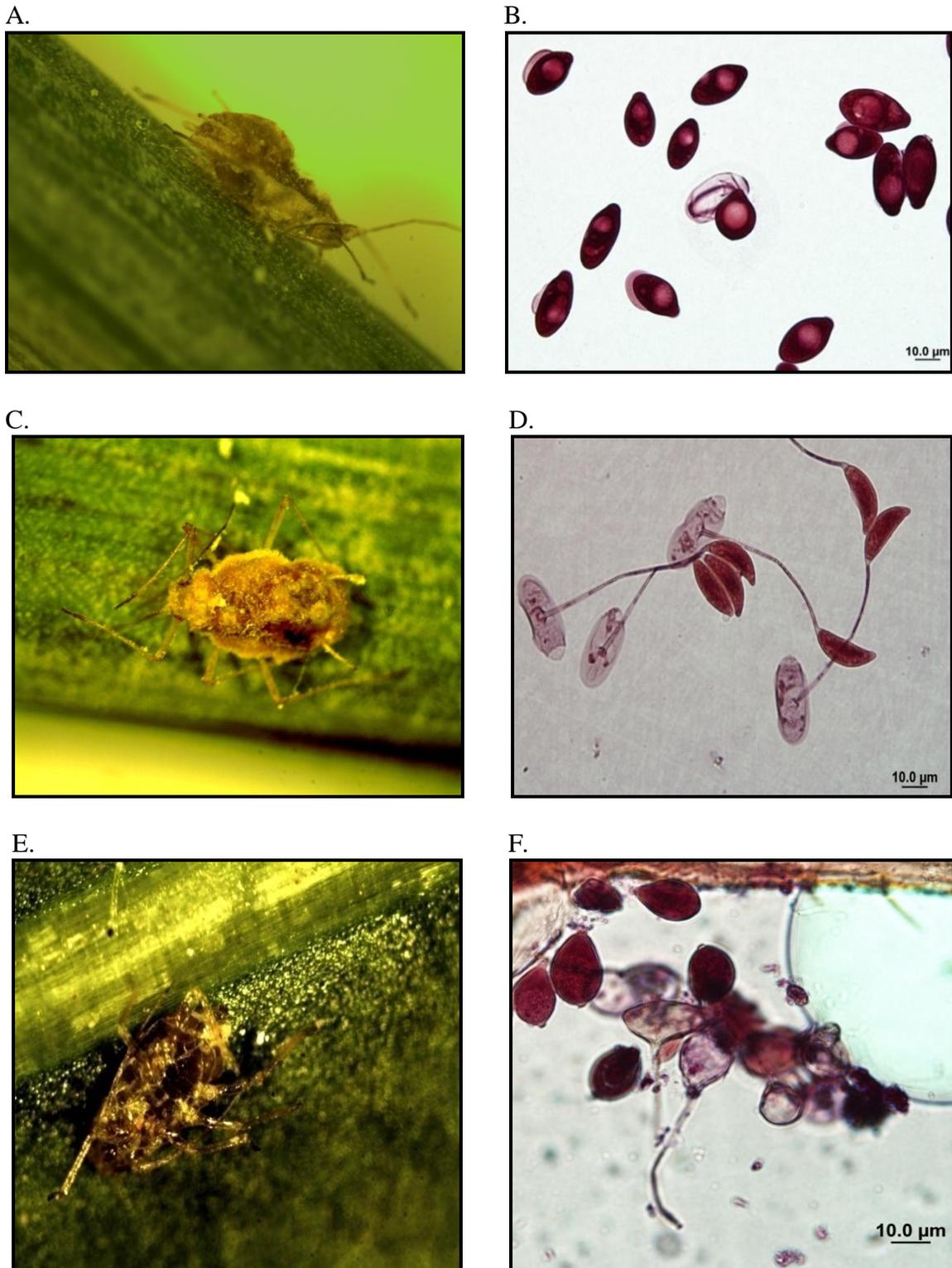


Fig. 2.3: Cadáveres de: **A.** *R. rufiabdominalis*, **C.** *R. maidis* y **E.** *S. graminum* infectados con **B.** *P. neoaphidis*, **D.** *Z. radicans* y **F.** *N. fresenii*, respectivamente.

De un total de 30989 áfidos detectados en los muestreos, 749 (2.4%) fueron registrados infectados con hongos. En el Sitio 1, se identificaron seis especies de áfidos (Tabla 2.3). El único patógeno registrado en este sitio fue *Z. radicans* (Tabla 2.4), y la

única especie de áfido infectada con este patógeno fue *S. avenae*. En el Sitio 2, se encontraron cuatro especies de áfidos (Tabla 2.3). *Pandora neoaphidis* y *Z. radicans* fueron los patógenos registrados en este sitio. *Pandora neoaphidis* se encontró infectando *S. graminum* y *R. rufiabdominalis* mientras que *Z. radicans* fue registrado en *S. graminum* y *S. maidis* (Tabla 2.4). En el sitio 3, se reconocieron seis especies de áfidos (Tabla 2.3) y las mismas dos especies de hongos registradas en el sitio 2. *Pandora neoaphidis* fue el patógeno predominante y fue registrado desde *S. graminum*, *R. maidis* y *R. padi*, mientras que *Z. radicans* fue encontrado infectando *S. maydis*, *R. maidis* y *R. padi* (Tabla 2.4). Seis especies de áfidos se registraron en el sitio 4 (Tabla 2.3). *Pandora neoaphidis* y *Z. radicans* fueron los patógenos registrados y fueron encontrados en tres cadáveres de áfidos cada uno (Tabla 2.4). En este sitio, *P. neoaphidis* fue encontrado infectando *R. rufiabdominalis* y *S. avenae*, mientras que *Z. radicans* fue registrado desde *R. rufiabdominalis*, *S. avenae* y *S. graminum*. En el sitio 5, únicamente dos especies de áfidos fueron registradas, *S. graminum* y *R. maidis* (Tabla 2.3). El único patógeno registrado en una única fecha de muestreo (3 de marzo de 2011) fue *N. fresenii* (Tabla 2.4). Finalmente, en el sitio 6, seis especies de áfidos fueron identificadas (Tabla 2.3). *Pandora neoaphidis* y *Z. radicans* (Tabla 2.4) fueron los patógenos registrados. *Pandora neoaphidis* fue encontrado infectando únicamente *R. rufiabdominalis*, mientras que *Z. radicans* fue observado en *R. rufiabdominalis* y *S. avenae*.

Tabla 2.4: Identificación de Hongos Entomophthorales en áfidos de cereales recolectados en Argentina durante 2010-2011.

Sitio	Fecha de muestreo*	Especie de áfidos	Nº de áfidos muertos examinados	Porcentaje de áfidos muertos con		
				<i>P. neoaphidis</i>	<i>Z. radicans</i>	<i>N. fresenii</i>
1	21 Oct 2011	<i>Sit. avenae</i>	172	0	100	0
1	28 Oct 2011	<i>Sit. avenae</i>	7	0	100	0
2	15 Apr 2010	<i>Sch. graminum</i>	4	0	100	0
2	12 May 2010	<i>Sch. graminum</i>	3	100	0	0
2	20 May 2010	<i>Sch. graminum</i>	5	100	0	0
2	02 Jul 2010	<i>R. rufiabdominalis</i>	2	100	0	0
2	05 Jul 2010	<i>Sip. maidis</i>	5	0	100	0
3	12 May 2010	<i>Sch. graminum</i>	15	100	0	0
3	20 May 2010	<i>Sch. graminum</i>	37	100	0	0
3	09 Jun 2010	<i>Sch. graminum</i>	251	100	0	0
3	24 Jun 2010	<i>R. maidis</i>	17	58.8	41.2	0
3	06 Jul 2010	<i>R. padi</i>	18	50.0	50.0	0
3	20 Jul 2010	<i>Sip. maidis</i>	7	0	100	0
4	06 Jul 2011	<i>Sch. graminum</i>	1	0	100	0
4	12 Jul 2011	<i>R. rufiabdominalis</i>	1	100	0	0
4	20 Jul 2011	<i>R. rufiabdominalis</i>	1	0	100	0
4	24 Ago 2011	<i>Sit. avenae</i>	1	0	100	0
4	14 Oct 2011	<i>Sit. avenae</i>	2	100	0	0
5	03 Mar 2011	<i>Sch. graminum</i>	173	0	0	100
6	23 Jun 2011	<i>R. rufiabdominalis</i>	11	100	0	0
6	07 Jul 2011	<i>R. rufiabdominalis</i>	6	50.0	50.0	0
6	12 Jul 2011	<i>R. rufiabdominalis</i>	8	100	0	0
6	21 Jul 2011	<i>R. rufiabdominalis</i>	1	0	100	0
6	17 Ago 2011	<i>Sit. Avenae</i>	1	0	100	0

\*Fueron incluidas únicamente las fechas de muestreo en las que infecciones fúngicas fueron registradas.

### Prevalencia y Estacionalidad

En nuestro estudio *P. neoaphidis* fue el patógeno más importante registrado desde *R. rufiabdominalis* en los Sitios 2 y 6 (avena) con una prevalencia máxima de 28.5% ( $n=7$ ) y 44.4% ( $n=18$ ) el 2 de julio de 2010 y 12 de julio de 2011, respectivamente (Tabla 2.5) (Fig. 2.5). En el sitio 2, micosis de *S. graminum* alcanzaron el 11.1% ( $n=45$ ) (Tabla 2.5) mientras en el sitio 6 no fueron registradas infecciones de *P. neoaphidis* en otras especies de áfidos, lo que sugeriría que son menos susceptibles a este patógeno en avena. Además, en ambos sitios un bajo número de áfidos fueron registrados infectados con *Z. radicans* (Tabla 2.5). Independientemente de las especies de hongos en el sitio 2, la tasa de infección entre las semanas de estudio no difirió significativamente ( $\chi^2 = 5.51$ ;  $df=6$ ;  $P > 0.05$ ). En el sitio 6 se registraron diferencias significativas ( $\chi^2 = 27.38$ ;  $df=11$ ;  $P < 0.05$ ), siendo detectadas durante las fechas del 23 de junio y del 12 de julio del 2011, las fechas con los mayores porcentajes de infección (Tabla 2.5) (Fig. 2.5).

En el Sitio 2, los niveles de infección entre las distintas semanas de observación fue variable, aunque se mantuvo en niveles bajos. Se registró el máximo porcentaje el 20 de mayo de 2010 (8,2%;  $n=61$ ) y el mínimo fue de 0,5% ( $n=402$ ) la semana siguiente (02-07-2010) (Fig. 2.5). El mayor porcentaje de infección fue coincidente con el mayor porcentaje de humedad relativa (86%) registrado durante el período de observaciones y con una temperatura de 18,3°C (Apéndice, Tablas i y ii). En el Sitio 6 correspondiente al cultivo de avena, los mayores porcentajes de infección registrados (10,9 y 30,8%) fueron coincidentes con los dos mayores porcentajes de humedad (83 y 85 %) y con temperaturas predominantemente bajas (durante junio y julio) (Apéndice, Tablas iii y iv).

Similarmente, *P. neoaphidis* fue el patógeno predominante en las poblaciones de áfidos en el sitio 3 con una prevalencia máxima de 90.2% ( $n=278$ ) el 9 de junio del 2010 (Tabla 2.5). Este nivel de infección se redujo significativamente dos semanas más tarde ( $p < 0.05$ ) (*U Mann-Whitney* = 467.5) (Tabla 2.5). En este sitio, las infecciones causadas por *Z. radicans* en poblaciones de áfidos fueron menos frecuentes que las infecciones de *P. neoaphidis* (Tabla 2.5). En el Sitio 3, áfidos infectados fueron registrados durante todas las fechas de muestreo, sin embargo los niveles de infección

variaron entre los momentos de observación registrándose el máximo porcentaje de infección (90,3%; n=278) el 9 de junio del 2010 (Fig. 2.5) con una temperatura de 11,2°C y una humedad relativa de 68% (Apéndice, Tablas i y ii). El mínimo porcentaje de infección (0,5 %; n=3456) se registró el 24 de junio de 2010 (Fig. 2.5) con una temp de 15,5°C y con la menor humedad relativa (48%) (Apéndice, Tablas i y ii) registrada durante todo el período de observaciones.

*Zoophthora radicans* fue el único patógeno registrado en el sitio 1, donde afectó únicamente a la especie *S. avenae* con una prevalencia máxima de 83.9% (n=205) observada el 21 de octubre del 2011 (Fig. 2.5) con una temperatura relativamente alta (23°C) y una humedad de 68% (Apéndice, Tablas iii y iv). Siete días después, el 28 de octubre del 2011, la incidencia de áfidos infectados disminuyó significativamente hasta 5.4% (n=128) (Tabla 2.5) ( $P < 0.05$ ) ( $U$  de Mann-Whitney = 7315.0). No se encontraron cadáveres de las otras cinco especies de áfidos mostrando signos de infección fúngica en este sitio.

Similarmente, en el sitio 4, *Z. radicans* fue la especie de patógeno predominante en poblaciones de *S. graminum* (50%; n=2) el 6 de Julio del 2011; *R. rufiabdominalis* (25%; n=4) el 20 de Julio del 2011 y *S. avenae* (12.5%; n=8) el 24 de agosto del 2011, mientras que las infecciones de *P. neoaphidis* en *R. rufiabdominalis* y en *S. avenae* fueron 16.6% (n=6) y 2.0% (n=98) el 12 de julio del 2011 y 14 de octubre del 2011, respectivamente (Tabla 2.5). El número de áfidos infectados en este sitio fue bajo. No se registraron diferencias significativas en el porcentaje de infección entre las semanas de estudio ( $\chi^2 = 11.4$ ; df=12;  $P > 0.05$ ). En el Sitio 4, se registraron pocos áfidos infectados a lo largo del ciclo del cultivo. El mayor porcentaje de infección fue 50% (n=2) (Fig. 2.5) y se registró con una humedad de 58% y una temperatura de 8°C (Apéndice, Tablas iii y iv).

En el sitio 5, infecciones naturales de *N. fresenii* en *S. graminum* alcanzaron un nivel de 18.3% (n=947) (Tabla 2.5) el 3 de Marzo del 2011 (Fig. 2.5). Esta semana fue significativamente diferente del resto ( $\chi^2 = 110.17$ ; df=9;  $P < 0.05$ ). El hecho de que no se hayan registrado infecciones fúngicas en *R. maidis* sugiere que esta especie de áfido podría ser menos susceptible a *N. fresenii* que *S. graminum*. En el cultivo de sorgo (Sitio 5) se registraron infecciones fúngicas en una única fecha de muestreo (03-03-

2011) con una temperatura de 25°C y una humedad relativa de 77% (Apéndice, Tablas iii y iv).

En cuatro de los seis sitios estudiados no fue posible establecer asociación entre la densidad de áfidos sanos y el porcentaje de áfidos infectados ya que los valores  $R^2$  obtenidos no fueron importantes (Tabla 2.6). Sin embargo, en los sitios 3 y 4 (correspondientes ambos a cultivo de trigo) los valores de  $R^2$  fueron de 0,612 y 0,78 respectivamente, lo que indica que el 61 y 78% de la variabilidad en el porcentaje de áfidos infectados pudo ser explicado en función de la densidad de áfidos sanos.

Las comparaciones en el número de áfidos infectados entre los estados de desarrollo (ninfas, adultos ápteros y adultos alados) relevaron que únicamente en el sitio 3 se encontraron diferencias en el número de áfidos infectados entre estadios de desarrollo, no siendo significativas estas diferencias para el resto de los sitios ( $p > 0,05$ ). En el sitio 3, mediante regresión logística binaria se comparó el riesgo de infección entre estadios de desarrollo, existiendo 2,01 y 0,66 más riesgo que se infecten ninfas que adultos ápteros y adultos alados respectivamente. A su vez hubo 0,32 más riesgo que se infecten adultos ápteros que adultos alados.

Hubo una distribución estacional de las infecciones fúngicas. Las micosis de hongos entomofthorales fueron observados en las poblaciones de áfidos hospedadores desde marzo hasta agosto (75.8%) y en una menor tasa entre los meses de septiembre hasta febrero (24.1%). *Pandora neoaphidis* fue registrado durante los meses de mayo del 2010, junio y julio en ambos años de observaciones y octubre del 2011. *Zoophthora radicans* fue registrado durante los meses de abril y junio en 2010, julio en ambos años como así también durante agosto y octubre en 2011. Finalmente, *N. fresenii* fue registrado únicamente durante el mes de marzo en 2011.

Tabla 2.5: Prevalencias de Hongos Entomophthorales registradas en poblaciones de áfidos en cultivos de cereales en Argentina durante 2010-2011.

Sitio	Fecha de muestreo*	% UM <sup>a</sup> con áfidos infectados	Nº medio de áfidos infectados por UM	Porcentaje de infección de						Áfidos totales	
				S. g	R. p	R. r	R. m	M. d	S. a		S. m
1	21-10-11	38.0 (19) <sup>b</sup>	9.05	0 (11) <sup>c</sup>	-	-	-	0 (54)	83.9 (205)	-	63.7 (270)
	28-10-11	6.0 (3)	2.3	-	-	-	-	0 (2)	5.4 (128)	-	5.3 (130)
2	15-04-10	4.0 (2)	2.0	0.58 (689)	-	-	-	-	-	-	0.58 (689)
	12-05-10	4.0 (2)	1.5	6.12 (49)	-	-	-	-	-	0 (2)	5.8 (51)
	20-05-10	6.0 (3)	1.6	11.1 (45)	0 (5)	0 (11)	-	-	-	-	8.2 (61)
	02-07-10	2.0 (1)	2.0	-	-	28.5 (7)	-	-	-	0 (395)	0.49 (402)
	05-07-10	4.0 (2)	2.5	-	-	-	-	-	-	3.75 (133)	3.75 (133)



	14-10-11	4.0 (2)	1	-	-	-	-	0 (33)	2.0 (98)	0 (35)	1.2 (166)
5	03-03-11	24 (12)	14.4	18.3 (947)	-	-	-	-	-	-	18.3 (947)
	23-06-11	8.0 (4)	2.7	0 (57)	-	26.1 (42)	-	-	0 (1)	0 (1)	10.9 (101)
	07-07-11	6.0 (3)	2.0	0 (9)	-	11.5 (52)	-	-	-	-	9.8 (61)
6	12-07-11	8.0 (4)	2.0	- (5)	- (3)	44.4 (18)	-	-	-	-	30.7 (26)
	21-07-11	2.0 (1)	1.0	-	-	2.2 (46)	-	-	-	-	2.2 (46)
	17-08-11	2.0 (1)	1.0	0 (1)	-	0 (34)	-	0 (11)	7.6 (13)	-	1.7 (59)

\*Fueron incluídas únicamente las fechas de muestreo en las que infecciones fúngicas fueron registradas.

<sup>a</sup> Unidad de muestreo (áfidos infectados).

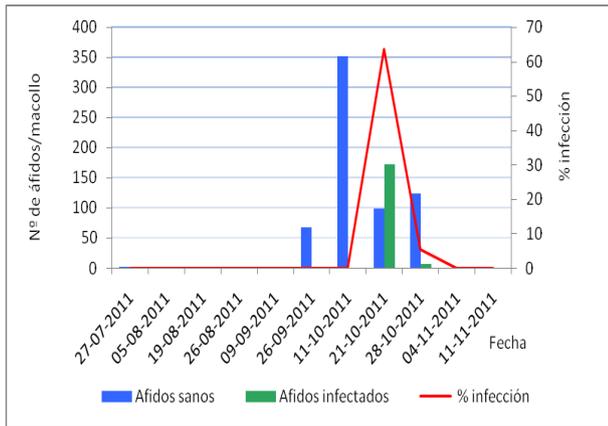
<sup>b</sup> Número de unidades de muestreo infectadas examinadas entre paréntesis.

<sup>c</sup> Número de áfidos en la muestra entre paréntesis.

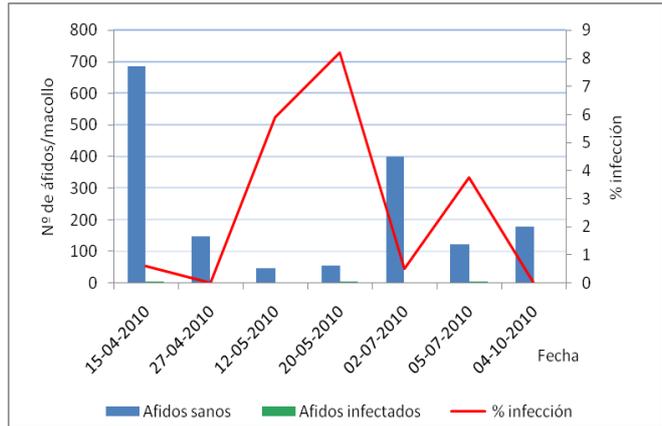
Tabla 2.6: Asociación entre la población hospedadora y el porcentaje de infección en cada uno de los sitios de estudio.

Sitio	Regresión lineal		
	Valor R <sup>2</sup>	Sig.	Ecuación
1	0.25	0.113	$y = 0.334x + 0.032$
2	0.14	0.531	$y = 0.188x + 0.091$
3	0.612	0.066	$y = -0.619x + 6.970$
4	0.78	0.357	$y = 0.070x - 0.074$
5	0.01	0.744	$y = -0.240x + 0.136$
6	0.19	0.456	$y = 0.222x - 0.293$

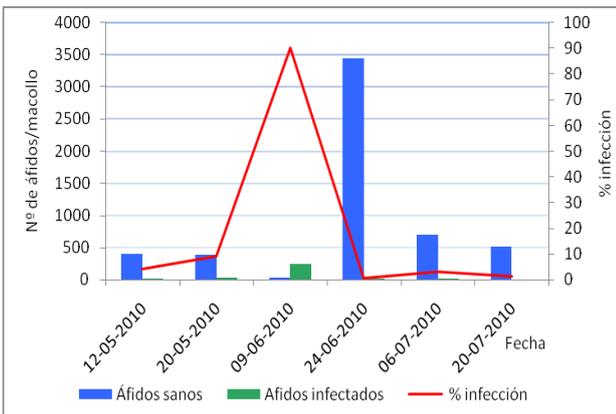
**Sitio 1**



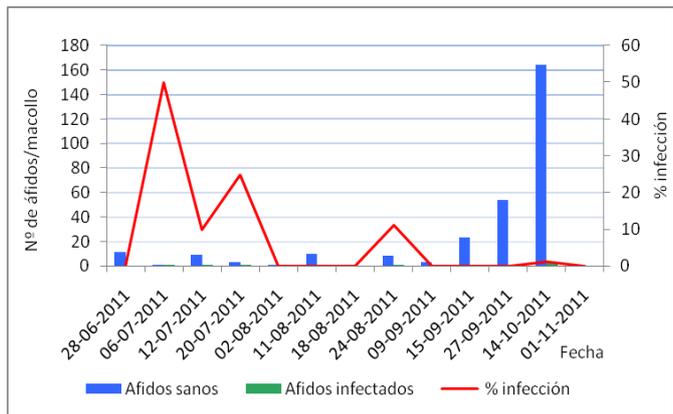
**Sitio 2**



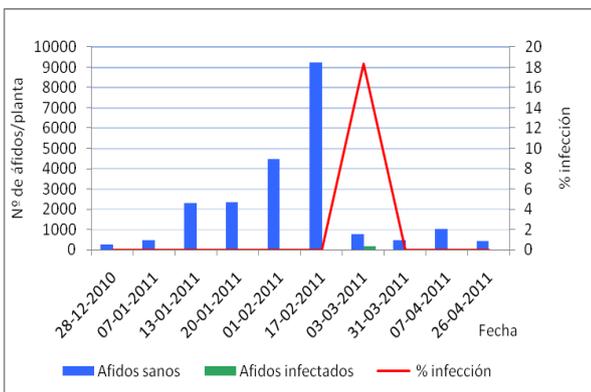
**Sitio 3**



**Sitio 4**



**Sitio 5**



**Sitio 6**

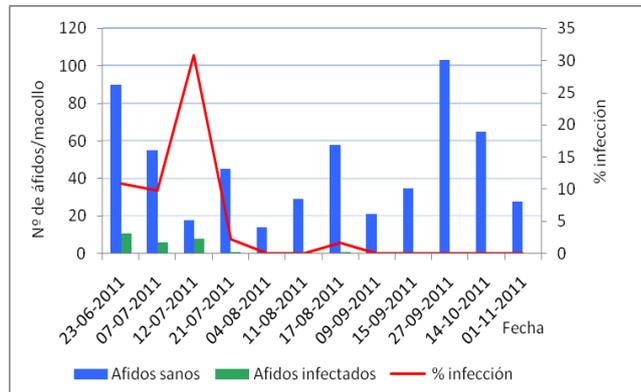


Figura 2.5: Prevalencia de hongos entomofthorales en los seis sitios de estudio.

## DISCUSIÓN

Tres especies de hongos entomophthorales patógenos de áfidos plaga fueron registradas en cultivos de cereales en Argentina. Estos registros constituyen los primeros para áfidos de cereales en la región Neotropical y en la región pampeana argentina. El registro de las especies *Pandora* sp. (Entomophthoraceae) y *Conidiobolus coronatus* (Costantin) Batko (Ancylistaceae) en un hemíptero plaga *Oliarus dimidiatus* Berg. (Hemiptera: Fulgoromorpha: Cixiidae), en arroz (Toledo *et al.*, 2008) constituye el único registro previo para esta región. Por otro lado, otras especies de hongos entomophthorales fueron registradas desde otras plagas de cultivos hortícolas (López Lastra & Scorsetti 2006; Scorsetti *et al.*, 2007, 2012). *Pandora neoaphidis* ha sido registrada desde más de 70 especies de áfidos (Pell *et al.*, 2001) y se destaca por ser la especie más prevalente entre las poblaciones naturales de áfidos en varios sistemas de cultivos (Feng *et al.*, 1992; Hatting *et al.*, 1999, 2000; Barta & Cagáñ, 2006; Díaz *et al.*, 2010; Scorsetti *et al.*, 2010). Un hecho similar es registrado en este estudio, con casi el 50% de los cadáveres de áfidos infectados con *P. neoaphidis*. *Pandora neoaphidis* es el agente causal más frecuente como causante de epizootias (Nielsen *et al.*, 2003). Steenberg & Eilenberg (1995) registraron una prevalencia de hasta el 60%. En nuestro estudio infecciones en *S. graminum* (Sitio 3) alcanzaron el 97.6% ( $n=257$ ) el 9 de junio de 2010. Además, en los sitios 2 y 6, niveles de infección en *R. rufiabdominalis* alcanzaron el 28.5 ( $n=7$ ) y 44.4% ( $n=18$ ) el 2 de julio de 2010 y 12 de julio de 2011, respectivamente, lo cual es consistente con las observaciones de Wraight *et al.* (1993). Del mismo modo, un estudio reciente de Scorsetti *et al.* (2010) registra a la especie *P. neoaphidis* infectando a *N. ribisnigri* en cultivo de lechuga en Buenos Aires, Argentina, con una prevalencia máxima de 56.6%. McLeod *et al.* (1998) registraron epizootias de *P. neoaphidis* en *M. persicae* en cultivo de espinaca durante los meses de invierno. Además, Steinkraus (2006) argumentó que *P. neoaphidis* es importante para el control de áfidos porque aparece temprano en la primavera, justo cuando las poblaciones de áfidos se establecen en varios cultivos. En Eslovaquia, Barta & Cagáñ (2006) identificaron a *P. neoaphidis* como una especie esporádica infectando a *Brevicoryne brassicae*, *M. persicae* y *Chaitophorus leucomelas* Koch (Hemiptera: Aphididae) subrayando así la amplia gama de huéspedes de éste patógeno. *Zoophthora radicans* fue secundario a *P. neoaphidis* en ocurrencia y fue identificado desde seis especies de áfidos plaga. Por el contrario, Feng *et al.* (1990) encontraron a *Z. radicans* únicamente

en unas pocas ocasiones y desde dos especies de áfidos (*M. dirhodum* y *S. avenae*). En este estudio, *Z. radicans* fue registrada en cuatro de los seis sitios estudiados y fue observado causando epizootias en *S. avenae* en trigo (Sitio 1) con micosis que alcanzaron el 83.9% ( $n=205$ ) durante octubre de 2011.

*Neozygites fresenii* ha sido registrado en todos los continentes (Bałazy, 1993; Keller, 1997) y muestra una alta tendencia como causante de epizootias en colonias densas de áfidos. Scorsetti *et al.* (2007), también registran a la especie *N. fresenii* únicamente en otoño y, afectando únicamente a una única especie de áfido, pero en ese estudio identifican a *N. fresenii* en cultivos hortícolas a diferencia de nuestro estudio realizado en cultivos de cereales. Existen registros de *N. fresenii* como patógeno de otras especies de áfidos tales como *Aphis gossypii* en algodón en California (Steinkraus *et al.*, 2002; Steinkraus & Boys, 2005), y en *B. brassicae*, *Myzus* sp. y *A. fabae* en cultivos hortícolas en Buenos Aires, Argentina (Scorsetti *et al.*, 2007). En Sudáfrica, *N. fresenii* fue identificado desde cuatro especies de áfidos – *Chaitophorus populialbae*, *Hyalopterus pruni*, *M. persicae* y *A. gossypii* (Hemiptera: Aphididae) – en las plantas hospedadoras *Populus canescens*, *Phragmites australis*, *Tropaeolum majus* y *Cuphea melvilla*, respectivamente (Hatting *et al.*, 1999); en Eslovaquia este hongo es conocido como patógeno de 24 especies de áfidos (Barta & Cagán, 2006).

Hubo una distribución estacional de las infecciones fúngicas, con hongos entomophthorales generalmente observados en las poblaciones de áfidos hospedadores desde marzo hasta agosto y en una menor tasa entre los meses de septiembre hasta febrero (primavera y verano en Argentina). Observaciones de Alzugaray *et al.* (2010) en Uruguay, registraron a *P. neoaphidis* como uno de los principales agentes de mortalidad de áfidos pero enfatizaron en que su actividad estuvo restringida a los meses de otoño e invierno. En Argentina, estudios previos de la fenología de hongos entomophthorales en diferentes poblaciones de insectos pero no en áfidos particularmente, encontraron que infecciones fúngicas fueron más comunes en la estación otoño-invierno (en el hemisferio sur, desde marzo a agosto) (López Lastra *et al.*, 2006; Toledo *et al.*, 2008). Las bajas temperaturas y las condiciones de humedad que prevalecen durante la estación de crecimiento en invierno, tienden a ser propicias para la ocurrencia de micosis de entomophthorales (Wraight *et al.*, 1993).

**CONCLUSIONES**

- Se identificaron tres especies patógenos de áfidos en cultivos de cereales.
- Las bajas temperaturas y alta humedad favorecieron la ocurrencia de micosis de hongos entomophthorales.
- El rango hospedador de áfidos para hongos entomophthorales fue extendido a seis especies de áfidos como nuevos registros de hospedadores para Argentina y para la región Neotropical.
- Los resultados de este estudio indicaron que los hongos entomophthorales tienen potencial para reducir las poblaciones de áfidos bajo condiciones de campo no controladas.
- Este estudio contribuyó a ampliar el conocimiento de los hongos entomopatógenos de áfidos en cultivos de cereales y a evaluar su potencial como agentes de control biológico.

A photograph of an eggplant plant. In the foreground, two dark purple eggplants hang from the stem, each with its characteristic green, lobed calyx. Above them, a light purple flower with a yellow center is in bloom. The background is filled with green, serrated leaves of the plant.

## **CAPÍTULO III: Hongos Entomophthorales patógenos de áfidos en Hortícolas<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Resultados parciales de este Capítulo fueron publicados en la Revista “Journal of Invertebrate Pathology”, ver Manfrino et al., 2014c.

## INTRODUCCIÓN

La producción hortícola mundial tuvo un crecimiento acumulado del 172% en el período 1980-2005, aumentando de 324 a 881 millones de toneladas. Este crecimiento fue debido principalmente al aumento de la producción de China que representa el 50% de la producción mundial (FAO, 2006). En Argentina la producción hortícola se distribuye a lo largo de todo el país, desde Ushuaia hasta La Quiaca, destacándose la provincia de Buenos Aires con una participación del 22.2% de la superficie cultivada. La superficie hortícola es de 235.321 hectáreas, que si se le agregan las 174 mil correspondientes a legumbres suman en total unas 409.321 hectáreas (INDEC, 2002). En la provincia de Santa Fe la superficie hortícola en 2002 sumaba un total de 27.539 hectáreas, lo que arroja una participación de 6.7% en el total nacional. El número de productores totales de la provincia para ese período rondaban los 1600, localizados en cuatro zonas específicas: Santa Fe capital, La Costa, Coronda, Rosario y zona norte (Ministerio de la producción de Santa Fe, 2009).

### Caracterización regional

Los establecimientos hortícolas del cinturón verde en la zona de la ciudad de Santa Fe se ubican, en su gran mayoría, en las localidades de Monte Vera, Recreo, Ángel Gallardo y Recreo Sur. En total se cultivan 1.161 hectáreas por año con un índice de utilización de la tierra de 1.27 ha/año. La superficie promedio destinada a horticultura por productor es de 6 hectáreas y el 50% de los productores trabaja entre 1 a 5 has. El distrito de Monte Vera presenta la mayor superficie destinada a horticultura con una superficie de 192.20 ha, representando el 21% del total de has del cinturón hortícola santafesino.

En esta zona se cultivan 43 productos en total, de los cuales el 99% son hortícolas. Según la cantidad de hectáreas, los cultivos de hoja son los que más se producen (53%), seguidos por los de frutos (zapallitos, berenjenas y otros) con el 18% y los de bulbo para hoja (cebolla de verdeo y puerro) con el 14%. Por su parte los productos de raíz y las legumbres, ésta última en estado inmaduro (chauchas y habas) representan apenas el 4 y el 2% de la superficie cultivada, respectivamente.

Dentro de los cultivos de hoja, se destacan como las más importantes a la acelga (83% de los casos), la lechuga crespita (63%), el repollo (63%), la espinaca (65%), la

lechuga repollada (52%), la rúcula (59%) y la achicoria (66%). Por su parte, los cultivos de raíz más significativos son remolacha (63%) y zanahoria (2%) y los de fruto zapallito (43%) y berenjena (19%). Por último dentro de las crucíferas se destacan el brócoli (39%) y el coliflor (30%).

En cuanto a las formas de producción, el 99% es al aire libre. El sistema de protección con media sombra es utilizado por 80 productores que suman un total de 98 has y por último hay 6 casos que tienen invernáculos que llegan a ocupar en total 2.5 has.

La forma de tenencia de la tierra predominante en la producción hortícola del cinturón verde de Santa Fe es de arrendamiento o alquiler (49%) y tierra propia (31%). En algunos casos (8%) hay propietarios de tierra que la producen y a la vez arriendan algunas hectáreas adicionales. El resto de los casos se reparten en situaciones tales como préstamo, comodato, fiscal y sucesión.

En cuanto a la tecnología, haciendo referencia al tipo de riego, la mayor cantidad de has se riegan por surco. Tanto el riego por goteo como por aspersión no son técnicas muy usadas en la zona, ya que apenas se riegan 19 y 11.5 has de esta forma, respectivamente.

El nivel de mecanización que existe en los predios hortícolas es variado. La herramienta más común es la mochila manual para la pulverización de los lotes, le sigue el tractor, la sembradora y por último la pulverizadora mecánica de arrastre. En menor medida se utilizan otros implementos para trabajar la tierra como arado y equipo de reja. En cuanto a la siembra, el 61% de los productores lo hace de forma manual, el 25% tiene algún tipo de sembradora mecánica, por lo general arrastrada por el tractor y un 1% siembra tanto de forma mecánica como manual.

Respecto a la disponibilidad de equipos de frío tanto para el transporte como para el almacenamiento pos-cosecha en el campo, el 66% de los productores no posee.

Un aspecto vinculado al nivel tecnológico en horticultura, es el uso o no de plantines para trasplante. El 82% de los productores los utiliza, de los cuales un 46% compra, el 16% los produce de forma propia y el 20% compra y produce.

Respecto a la mano de obra, en el 95% de los casos la mano de obra es familiar y el 5% es contratado.

En referencia a los servicios públicos básicos que inciden en la calidad de vida de los productores, sus familias y personas que trabajan en los predios, el 98% dispone de luz corriente, pero solo el 9% cuenta con agua potable y el 5% tiene cloacas.

En relación a la venta de productos el 42% de los casos los comercializa a través de un comisionista, el 28% lleva todas las semanas su producción al mercado y vende en forma directa y, el 6% de los productores venden directo a verdulerías en la ciudad de Santa Fe.

#### Limitantes productivas por artrópodos plaga

La actividad hortícola tiene entre sus limitantes a los artrópodos plaga, pudiéndose citar entre los más perjudiciales a *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae), *Tetranychus* spp. (Acari: Tetranychidae), “trips” (Thysanoptera: Thripidae), “pulgonés” (Hemiptera: Aphididae), “minadores de hojas” (Diptera: Agromyzidae) y “orugas defoliadoras” (Lepidoptera: Noctuidae) (Botto, 1999).

Los áfidos son uno de los factores más importantes que limitan la producción de cultivos hortícolas en la Argentina. Entre las principales especies de áfidos que afectan a los cultivos hortícolas se mencionan las especies *Brevicoryne brassicae* (L.), *Aphis fabae* Scopoli, *Aphis gossypii* Glover, *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Myzus* sp., *Myzus persicae* (Sulzer), *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) y *Capitophorus elaeagni* (del Guercio) (Botto, 1999).

En el cinturón hortícola santafesino, el control de artrópodos plaga se realiza exclusivamente mediante la utilización de activos químicos. En algunos casos como lo es en el cultivo de *Solanum lycopersicum* L. (tomate) se realizan hasta 3 aplicaciones por semana lo que causa problemas de resistencia en los insectos “blanco” además de los riesgos ambientales ya mencionados (ver “Control Químico en Introducción General). En la búsqueda de alternativas, el estudio de los hongos patógenos de insectos adquiere una real importancia como paliativo frente a los efectos causados por los insecticidas tanto en el ambiente como en la salud de trabajadores y consumidores.

Existen registros a nivel de mundial de hongos entomofthorales como patógenos de áfidos en cultivos hortícolas. MacLeod (1955) colectaron *Macrosiphum pisi* en huertas en Nueva Escocia, Canadá, y encontraron que el 76.1% estuvieron infectados con *P. neoaphidis*. MacLeod *et al.* (1976) registraron que *E. planchoniana* destruyó una población de *Aphis rumicis* en Inglaterra. McLeod *et al.* (1998) registraron epizootias causadas por *P. neoaphidis* en poblaciones de *M. persicae* en espinaca, (*S. oleracea*) en Arkansas. En la región central de España, Díaz *et al.* (2008) han identificado a *P. neoaphidis* como la especie predominante sobre *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) y *N. ribisnigri* en lechuga, sobre *A. fabae* en acelga tanto en otoño como en primavera y sobre *A. gossypii* en cultivos de pepino en primavera y calabacín en otoño. También se identificó la especie *Conidiobolus coronatus* (Constantin) en *A. fabae* en individuos recogidos en acelga durante la primavera y en *M. euphorbiae* en cultivos de lechuga en otoño.

En nuestro país, en cultivos intensivos se han citado varias especies de hongos como patógenos de insectos plaga. Entre ellos, *Neozygites aff. floridana* (Zygomycota: Zygomycetes: Entomophthorales) como patógeno de la “arañuela roja”, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), importante plaga de cultivos de tomate, pimiento, berenjena, y otras hortalizas (Scorsetti y López Lastra, 2007) en el cinturón hortícola del Gran La Plata. *Zoophthora radicans* y *E. planchoniana* fueron previamente registrados como patógenos de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) y de *M. persicae* (Hemiptera: Aphididae), respectivamente en la provincia de Buenos Aires (Lopez Lastra y Scorsetti, 2006).

Scorsetti *et al.* (2006) citan a las especies *A. fabae*, *A. gossypii*, *B. brassicae*, *L. erysimi*, *M. euphorbiae*, *Myzus sp.*, *M. persicae*, *N. ribisnigri* y *C. elaeagni* como hospedadores de seis especies de hongos patógenos. *C. obscurus*, *E. planchoniana*, *N. fresenii*, *Z. radicans* y *Zoophthora sp.* Estos autores citaron a *P. neoaphidis* como el patógeno predominante de áfidos y fue encontrado durante el verano (Diciembre–Marzo).

En el cinturón hortícola santafesino existen escasos registros de utilización de agentes de control biológico para control de insectos. Entre ellos la utilización de Bt para control de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) es el único de aplicación de agentes biológicos (Salto, 2008). En referencia a hongos patógenos, Betolaccini *et al.*

(2010) citan hongos patógenos como factor de mortalidad de *P. xylostella* pero no identifican las especies patógenas.

## OBJETIVOS

- Relevar cultivos de *Lactuca sativa*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Solanum melongena*, *Capsicum annuum*, *Brassica oleracea* var. *italica*, *Solanum lycopersicum*, *Phaseolus vulgaris* y hospederas alternativas relacionadas en el cinturón hortícola santafesino.
- Identificar los hongos patógenos como factor de mortalidad de áfidos.
- Estudiar las variaciones poblacionales de los áfidos asociada a los niveles de infecciones fúngicas.
- Determinar la prevalencia de las infecciones fúngicas en cada uno de los cultivos.
- Investigar la relación entre el nivel de infección fúngica y la densidad de la población hospedadora.
- Comparar el número de áfidos infectados entre los estados de desarrollo del hospedador.
- Relacionar el porcentaje de infección fúngica con las condiciones ambientales específicas como humedad relativa, temperatura y aplicación de insecticidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

### Estudio a campo

El estudio se llevó a cabo en cultivos comerciales, en dos localidades del cinturón hortícola santafesino, Monte Vera (31°32'58.21'' S/60°41'34.74'' W) y Recreo (31°33'28.80'' S/60°43'38.60'' W). En el primero se estudiaron cultivos al aire libre de berenjena, brócoli, coliflor, repollo, tomate, chaucha y lechuga y en Recreo se relevaron cultivos de pimiento bajo invernadero. En todos los casos el manejo de las poblaciones de artrópodos plagas fue realizado de manera convencional.

### Muestreo de áfidos

Los siguientes cultivos fueron monitoreados entre los años 2010 y 2013:

- *Brassica oleracea* var. *capitata* L. (repollo) (Fig. 3.1): desde el 18 de mayo al 5 de agosto del 2010.
- *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. (coliflor): desde el 1 de junio al 16 de julio del 2010 y desde el 8 de abril al 20 de julio del 2011.
- *Lactuca sativa* L. (lechuga): desde el 16 de junio al 7 de septiembre del 2010.
- *Solanum lycopersicum* L. (tomate): se estudiaron dos cultivos pertenecientes a dos productores diferentes.
  - Sitio 1: desde el 7 de septiembre al 17 de diciembre del 2010.
  - Sitio 2: desde el 27 de agosto al 17 de diciembre del 2010.
- *Solanum melongena* L. (berenjena) (Fig. 3.2): desde el 8 de octubre del año 2010 hasta el 5 de mayo del año 2011.
- *Capsicum annum* L. (pimiento) (Fig. 3.1): desde el 29 de marzo hasta el 21 de diciembre del 2011.
- *Phaseolus vulgaris* L. (chaucha): desde el 21 de octubre al 21 de diciembre del 2011
- *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck (brócoli) (Fig. 3.1): de estación primavera-verano: desde el 28 de diciembre del 2012 al 31 de mayo del 2013 y de estación otoño-invierno: desde el 25 de marzo al 24 de julio del 2013.

Para la cuantificación de áfidos, veinte plantas en cada cultivo fueron aleatoriamente seleccionadas y observadas. En cultivos de hoja fue revisada la planta en su totalidad, mientras que en el caso de verduras de fruto se seleccionaron dos hojas correspondientes a cada estrato (superior, medio e inferior) para ser muestreadas. Para el análisis de los datos, cada muestra fue considerada una unidad. El muestreo estratificado se utilizó a fines de que el muestreo abarque toda la planta. Las poblaciones de áfidos fueron cuantificadas por observación directa (Fig. 3.2). La identificación de los hongos patógenos se realizó de acuerdo a las metodologías detalladas en el Capítulo 1.





Fig. 3.1: Cultivos de *C. annuum* (bajo invernadero), y de *B. oleracea* var. *capitata* y *B. oleracea* var. *italica* al aire libre, correspondientes a las quintas en las cuales fueron realizados los muestreos.



Fig. 3.2: Muestreo y cuantificación de áfidos en cultivo de *S. melongena*.

## RESULTADOS

Las especies de áfidos *M. persicae*, *Myzus ascalonicus*, *Myzus* sp., *B. brassicae*, *L. erysimi*, *Lipaphis pseudobrassicae*, *Pemphigus populitransversus*, *A. gossypii*, *A. fabae*, *Aphis* sp., *N. ribisnigri*, *Toxoptera odinae*, *M. euphorbiae* y *Rhopalosiphum rufiabdominalis* fueron registradas como hospedadores de los cultivos estudiados (Tabla 3.1). Las especies de hongos entomofitiales *P. neoaphidis*, *Z. radicans*, *E. planchoniana* y *Zoophthora* sp. fueron registradas como patógenas de *M. persicae*, *B. brassicae*, *N. ribisnigri*, *Aphis* sp. y *M. euphorbiae* en cultivos de *B. oleracea* var. *capitata*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *B. oleracea* var. *italica*, *L. sativa*, *S. melongena* y *C. annuum*. *Myzus persicae* y *B. brassicae* fueron las especies predominantes en cultivos mientras que el resto de las especies de áfidos mencionadas fueron registradas sólo ocasionalmente.

En cultivos de *S. lycopersicum* y de *P. vulgaris* no se registraron infecciones fúngicas en áfidos durante los períodos de muestreo y en ambos cultivos fueron observados gran número de áfidos muertos.

*Pandora neoaphidis* y *E. planchoniana* fueron registradas causando epizootias en *M. persicae* en *S. melongena* y en *C. annuum*. Mientras que *Z. radicans* provocó altos niveles de infección fúngica en *B. brassicae* en cultivos de *B. oleracea* var. *italica*.

Tabla 3.1: Listado de especies de áfidos identificados por cultivo, especies fúngicas registradas por especie de áfido y fecha de observación.

Cultivo	Hospedador	Especie fúngica	Fecha
Brassica oleracea var. capitata	<i>Myzus persicae</i>	<i>Z. radicans</i>	24-06-2010
		<i>E. planchoniana</i>	07-09-2010
	<i>Myzus</i> sp.	<i>Z. radicans</i>	16-06-2010
	<i>B. brassicae</i>	<i>Z. radicans</i>	16-06-2010
	<i>Lipaphis erysimi</i>		
	<i>Lipaphis pseudobrassicae</i>		
	<i>Pemphigus populitransversus</i>		
Lactuca sativa	<i>Myzus ascalonicus</i>		
	<i>Aphis gossypii</i>	<i>P. neoaphidis</i>	
	<i>Myzus persicae</i>	<i>P. neoaphidis</i>	16-06-2010
		<i>E. planchoniana</i>	24-06-2010
	<i>Myzus</i> sp.	<i>P. neoaphidis</i>	16-07-2010

	<i>Nasonovia ribisnigri</i>	<i>P. neoaphidis</i> <i>E. planchoniana</i>	05-08-2010
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	<i>Myzus persicae</i>	<i>P. neoaphidis</i>	01-06-2010
	<i>Lipaphis pseudobrassicae</i>		16-06-2010
	<i>Myzus sp.</i>	<i>P. neoaphidis</i>	24-06-2010
	<i>B. brassicae</i>	<i>Z. radicans</i>	05-05-2011
			09-05-2011
			13-05-2011
			24-06-2011
			01-07-2011
			08-07-2011
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	<i>B. brassicae</i>	<i>P. neoaphidis</i> <i>Z. radicans</i>	27-05-2012
			16-03-2013
	<i>M. persicae</i>	<i>P. neoaphidis</i> <i>Z. radicans</i>	25-03-2013
			05-04-2013
			08-04-2013
			19-04-2013
			22-04-2013
			23-04-2013
			17-05-2013
			22-05-2013
			27-05-2013
			31-05-2013
			07-06-2013
			14-06-2013
			24-06-2013
			16-07-2013
	<i>Myzus persicae</i>	<i>P. neoaphidis</i> <i>E. planchoniana</i>	30-12-2010
<i>Solanum melongena</i>			04-01-2011
			10-01-2011
			18-01-2011
			09-02-2011
	<i>Aphis fabae</i>		
	<i>Aphis gossypii</i>		
	<i>Toxoptera odinae</i>		
	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>		
	<i>Rhopalosiphum rufiabdominalis</i>	-	
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Myzus persicae</i>	-	
	<i>Aphis gossypii</i>	-	
	<i>Aphis sp.</i>	-	
	<i>Myzus persicae</i>	<i>P. neoaphidis</i> <i>E. planchoniana</i>	11-10-2011
			21-10-2011
			28-10-2011

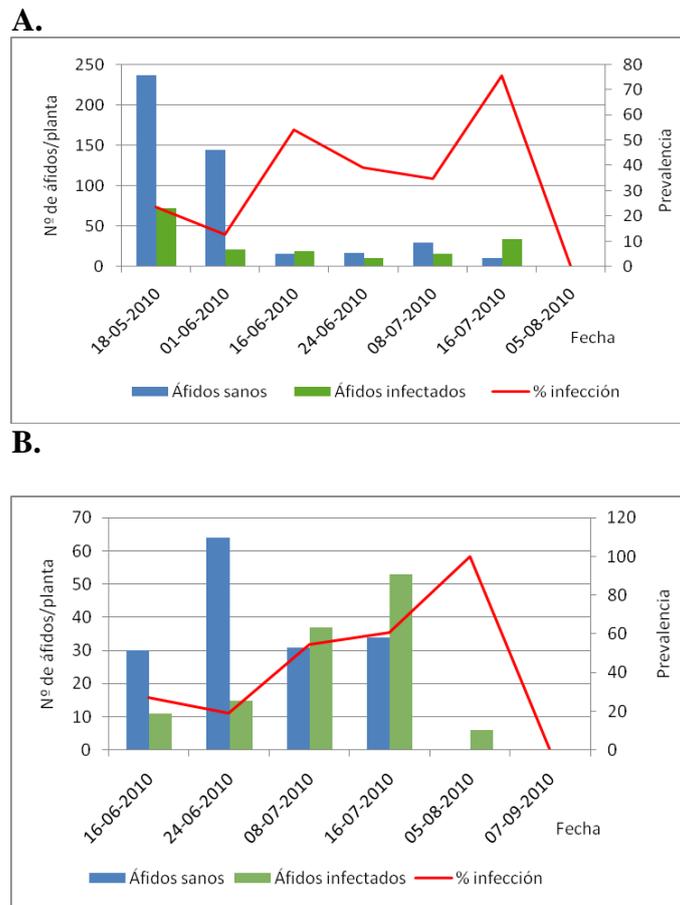
	04-11-2011
<i>Capsicum</i>	<i>Myzus ascalonicus</i>
<i>annuum</i>	<i>Myzus</i> sp.
	<i>Aphis</i> sp.
	<i>Macrosiphum</i> <i>euphorbiae</i>

Variaciones poblacionales de áfidos sanos e infectados.

*Lactuca sativa* y *B. oleracea* var *capitata*

En *B. oleracea* var *capitata* perteneciente al año 2010, en la primera fecha de muestreo (18 de mayo) se observó una importante densidad poblacional, como así también un alto número de áfidos infectados que disminuyó significativamente hacia la siguiente y sucesivas semanas hasta alcanzar la cuarta, momento en el cual comienza a aumentar la densidad de áfidos infectados hasta que en la sexta semana (16 de julio) se registra el máximo porcentaje de infección (75.6 %; n=45) (Fig. 3.3 a). Es importante señalar que este importante nivel de infección fue registrado en coincidencia con la temperatura más baja registrada durante el período de observaciones (Apéndice, Tabla v).

En el cultivo de *L. sativa* del año 2010 se observaron importantes niveles de infección en áfidos durante todo el período de observaciones. Se estima que la población de áfidos infectados mantuvo bajas las densidades poblacionales de áfidos sanos. Al igual que en *B. oleracea* var *capitata* estudiado el mismo año, el mayor porcentaje de infección (60.9 %; n=87) fue registrado el 16 de julio (Fig. 3.3 b), en coincidencia con el registro de la menor temperatura medida durante el período de observaciones. En ambos cultivos, los mayores porcentajes de infección fueron observados el 16 de julio y fueron registrados con una temperatura de 6.6°C y 68 % de humedad relativa (Apéndice, Tabla v y vi).



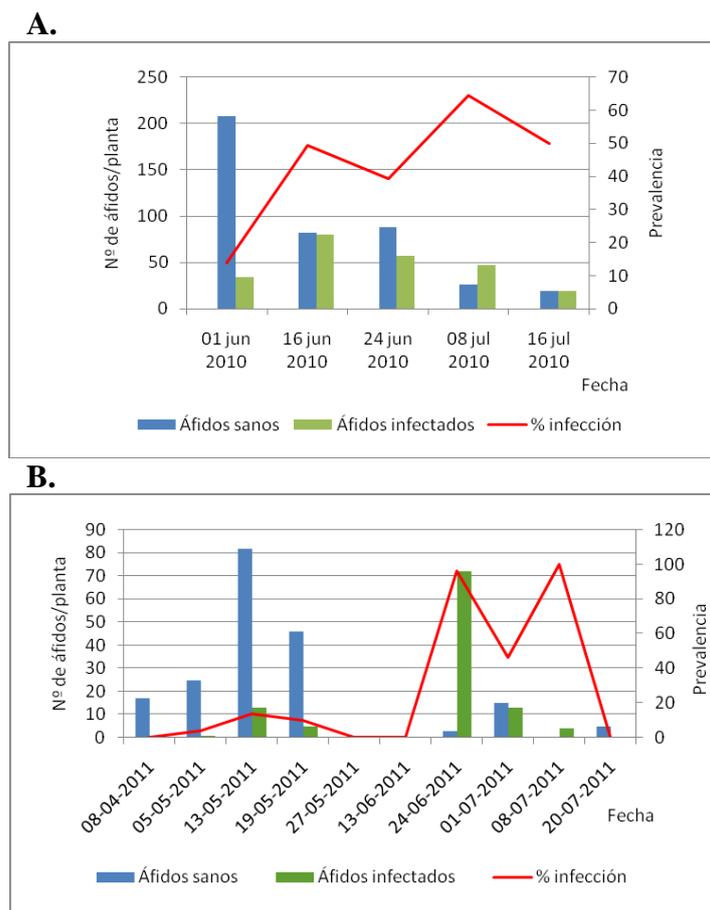
Figuras 3.3: Variaciones poblacionales de áfidos sanos e infectados en *B. oleracea* var. *capitata* (A) y en *L. sativa* (B). El porcentaje de infección (prevalencia) se expresa en porcentajes.

Comparación de dos cultivos de *Brassica oleracea* var. *botrytis* entre dos años de muestreo (2010-2011).

Al comparar dos cultivos de *B. oleracea* var. *botrytis* entre dos años de estudio, encontramos que en el año 2010 ocurrieron importantes densidades poblacionales durante las primeras fechas de observación registrándose además áfidos infectados durante todo el período de muestreo. La densidad de áfidos sanos disminuyó gradualmente hacia las últimas semanas, reducción que pudo estar inducida por las micosis desarrolladas que alcanzaron su máximo el 8 de julio con un porcentaje de infección de 64.4 % (n=73) (Fig. 3.4 a). Mientras que en el cultivo de *B. oleracea* var. *botrytis* correspondiente al año 2011 la densidad de áfidos sanos se mantuvo baja durante todo el período de observaciones. La proporción de áfidos infectados fue variable entre las fechas de muestreo, observándose el mayor número de áfidos infectados el 24 de junio, fecha en la cual se registró el mayor porcentaje de

infección (96 %, n=75). Hacia la siguiente fecha de observación se observó una significativa reducción en el número de áfidos infectados disminuyendo a cero hacia la última semana de registros, momento que coincide con el final del ciclo del cultivo (Fig. 3.4 b).

Los mayores porcentajes de infección fueron registrados el 8 de julio del 2010 y el 24 de junio del 2011 en cultivos de *B. oleracea* var. *botrytis* de los años 2010 y 2011 respectivamente (Fig. 3.4 a y b) y han sido observados con una temperatura de 10.7°C (coincidente para ambos cultivos) y con porcentajes de humedad relativa de 67 % y 87 % respectivamente (Apéndice, Tabla v, vi, vii y viii).

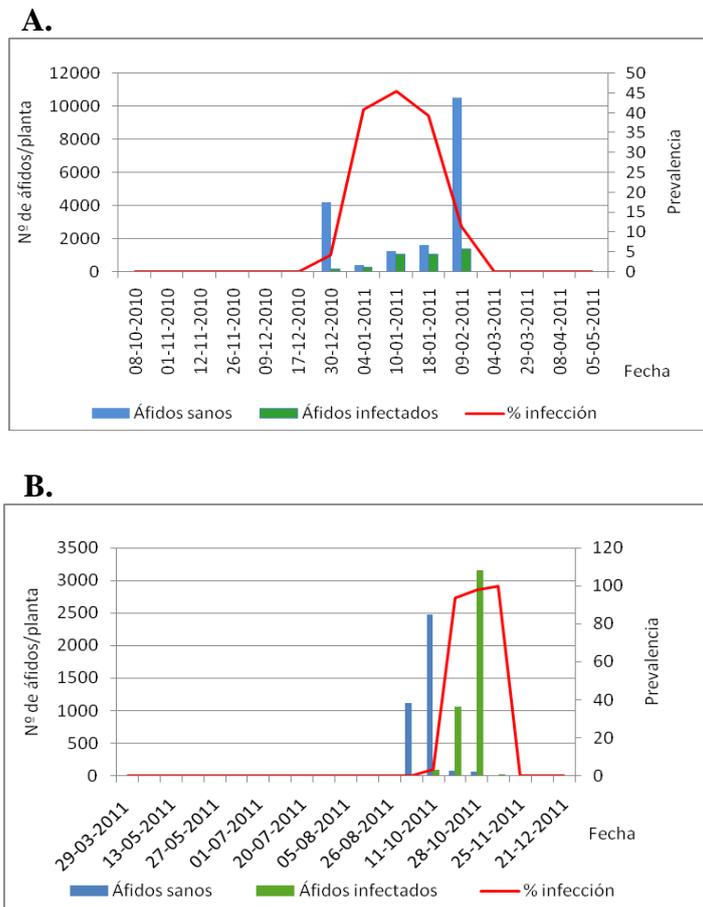


Figuras 3.4: Variaciones poblacionales de áfidos sanos e infectados en dos cultivos de *B. oleracea* var. *botrytis*, pertenecientes al año 2010 (A) y 2011 (B). El porcentaje de infección (prevalencia) se expresa en porcentajes.

*Solanum melongena* y *Capsicum annuum*

En ambos cultivos fueron observadas amplias fluctuaciones en las densidades poblacionales de áfidos sanos e infectados entre las fechas de muestreo (Fig. 3.5 a y b). En *S. melongena* las primeras colonias de áfidos fueron registradas el 1 de noviembre de 2010 y el mayor número de áfidos fue 10505 (número total de áfidos encontrados en la totalidad de plantas muestreadas) (525.2 áfidos/planta) registrado el 9 de febrero del 2011. Áfidos infectados fueron encontrados desde el 30 de diciembre del 2010 hasta el 9 de febrero del 2011, con un promedio mensual de temperatura de 26.1°C (Apéndice, Tabla v y vii). La mayor prevalencia alcanzada por las infecciones fúngicas fue 45.5% (n = 2296) registrado el 10 de enero del 2011 (Fig. 3.5 a).

En *C. annuum*, las primeras colonias de pulgones fueron observadas el 15 de septiembre del 2011. El pico en la densidad de la población (123.7 áfidos/planta) ocurrió el 11 de octubre del 2011 y coincidió con la aparición de las primeras colonias de áfidos infectados. Luego, el número de pulgones infectados se incrementó significativamente en la semana siguiente (21 de octubre) ( $p < 0.05$ ) (*U Mann-Whitney* = 3530.32). El mayor número de áfidos infectados fue registrado el 28 de octubre del 2011 (3152 áfidos totales) mientras el mayor porcentaje de infección fue observado el 4 de noviembre del 2011 (100%, n=15). El promedio de temperatura durante octubre y noviembre fue 21°C (Apéndice, Tabla vii). Después de esta fecha se produjo un marcado descenso en el número de áfidos sanos e infectados (Fig. 3.5 b) que coincidió con el final del ciclo del cultivo.



Figuras 3.5: Variaciones poblacionales de áfidos sanos e infectados en *S. melongena* (A) y en *C. annuum* (B). El porcentaje de infección (prevalencia) se expresa en porcentajes.

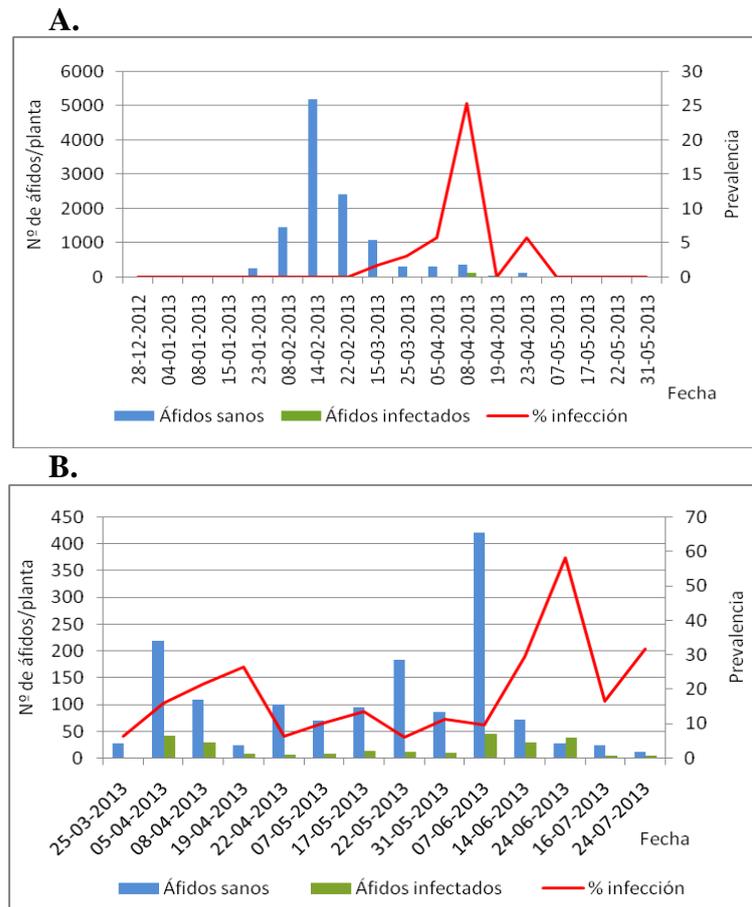
Comparación entre un cultivo de *B. oleracea* var. *italica* de estación primavera-verano y uno de estación otoño-invierno.

En el cultivo de *B. oleracea* var. *italica* de la estación primavera-verano se observó un progresivo aumento de la población de áfidos sanos desde las primeras semanas de muestreo (diciembre-enero) hasta la séptima fecha de muestreo (14 de febrero del 2013), momento en el cual se observa el pico en la densidad poblacional y partir del cual comienza a disminuir el número de áfidos sanos. En la novena fecha (15 de marzo del 2013) se registraron las primeras colonias de áfidos infectados, alcanzándose el pico en la densidad de infectados la semana del 8 de abril del 2013, momento en el cual fue observado el mayor porcentaje de infección (25.4 %; n=503). Inmediatamente luego de ocurrido este pico, el número de áfidos infectados disminuyó significativamente hacia la siguiente semana en simultáneo a la observación de una notable disminución en la población de áfidos sanos (Fig. 3.6 a).

En el cultivo de *B. oleracea* var. *italica* correspondiente a la estación otoño-invierno se observaron importantes variaciones poblacionales tanto en la densidad de áfidos sanos como infectados. Los niveles de infección variaron entre 6.1 % (n=196) y 58.2 % (n=67) durante el período de observaciones. El mayor porcentaje de infección (58.2 %, n=67) se observó luego de que se registrara la mayor densidad de áfidos sanos durante las semanas inmediatamente anteriores (Fig. 3.6 b).

Los mayores porcentajes de infección en los cultivos de brócoli de estación primavera-verano y de estación otoño-invierno fueron de 25,4% (n=503) y 58.2 % (n=67) registrados las semanas del 8 de abril del 2013 (temperatura de 15.9°C y 67 % de humedad relativa) y del 24 de junio del 2013 (temperatura de 11.1°C y 89 % de humedad relativa) (Apéndice, Tablas x y xi).

Al comparar los cultivos entre ambas estaciones, observamos que las densidades de áfidos sanos fueron más elevadas en el cultivo correspondiente a la estación primavera-verano ( $p < 0.05$ ; *U Mann Whitney* =5637.0). Mientras que la aparición de áfidos infectados fue más frecuente en el cultivo perteneciente a la estación otoño-invierno, registrándose en este caso áfidos infectados durante todo el período de muestreo. En el caso del brócoli de estación primavera-verano la ocurrencia de áfidos infectados estuvo restringida a los meses de marzo y abril, cuando las temperaturas descendieron y los porcentajes de humedad fueron elevados. En relación a los porcentajes de infección en ambos cultivos, se observó que el registrado en *B. oleracea* var. *italica* de estación otoño-invierno fue mayor al registrado en el mismo cultivo pero de estación primavera-verano. El número de áfidos infectados registrados en el cultivo de estación otoño-invierno fue significativamente más elevado que el observado en el cultivo de estación primavera-verano ( $p < 0.05$ ; *U Mann Whitney* = 641).



Figuras 3.6: Variaciones poblacionales de áfidos sanos e infectados en *B. oleracea* var. *italica* de estación primavera-verano (A) y de estación otoño-invierno (B). El porcentaje de infección (prevalencia) se expresa en porcentajes.

#### Relación entre el porcentaje de infección y la densidad de la población hospedadora

Para cada cultivo, la prevalencia de áfidos infectados fue correlacionada con la densidad de la población hospedadora por fecha de muestreo. En la mayoría de los cultivos no se registró asociación entre la densidad de la población hospedadora y el número de áfidos infectados (Tabla 3.2). El valor de  $R^2$  fue importante únicamente en cultivo de berenjena en el que el 83 % de la variabilidad pudo ser explicada por el modelo de regresión. Esto significa que el número de áfidos que murió debido a infecciones fúngicas aumentó cuando la densidad de la población hospedadora se incrementó (Fig. 3.7 A-H).

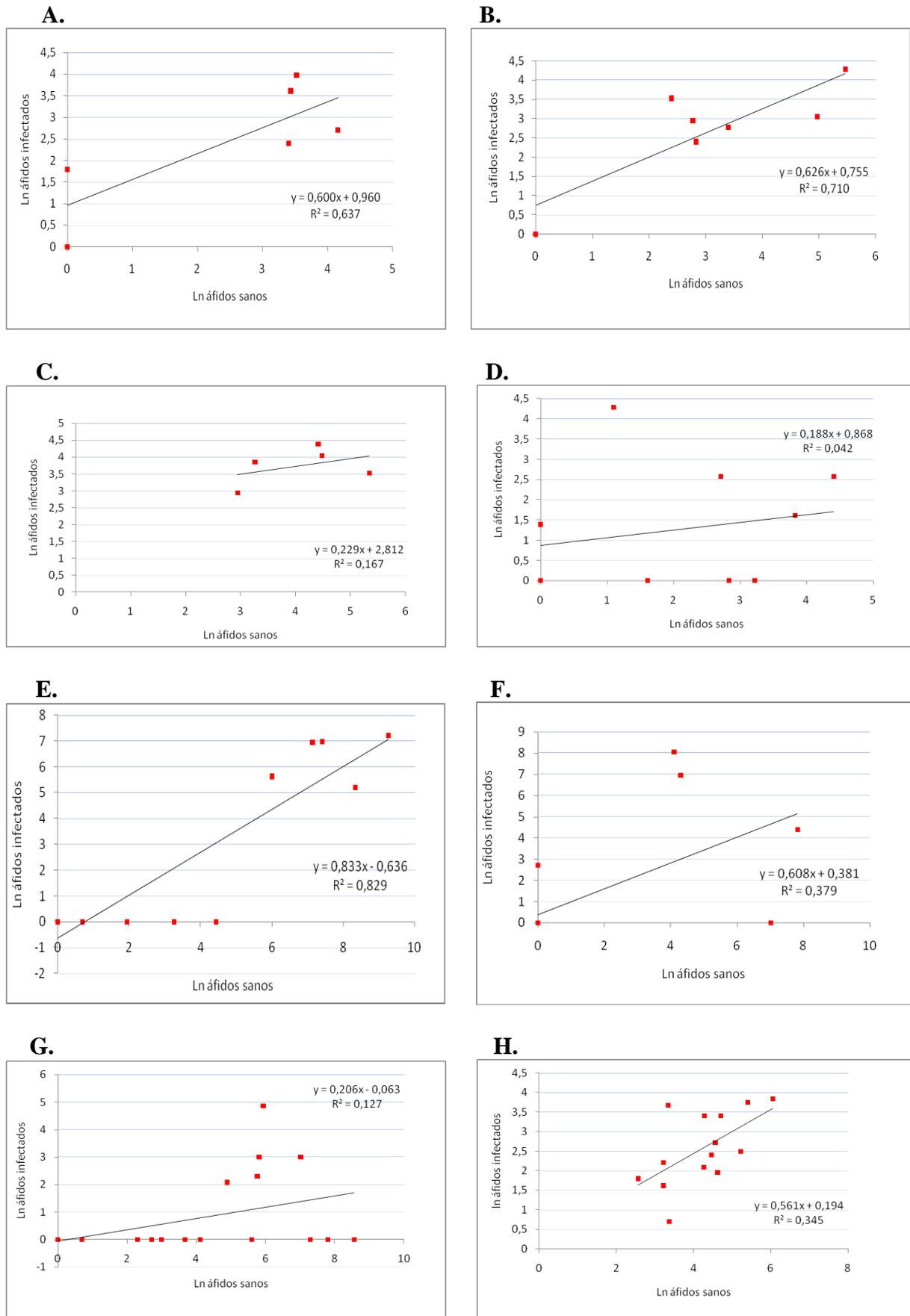


Fig. 3.7: Asociación entre la densidad de áfidos infectados y sanos en cada uno de los cultivos. A. *L. sativa*. B. *B. oleracea* var. *capitata*. C. *B. oleracea* var. *botrytis* 2010. D. *B. oleracea* var. *botrytis* 2011. E. *S. melongena*. F. *C. annuum*. G. *B. oleracea* var. *italica* estación primavera-verano. H. *B. oleracea* var. *italica* estación otoño-invierno.

Relación entre las infecciones fúngicas y los estados de desarrollo del hospedador

Cuando se estudió y se comparó la proporción de áfidos infectados de acuerdo a los estados de desarrollo de los áfidos, se encontró que en todos los cultivos excepto en el cultivo de *B. oleracea* var. *botrytis* perteneciente al año 2011, hubo diferencias significativas en el número de áfidos infectados entre los estados de desarrollo ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3.2) (Fig. 3.8 A, B, C, E, F, G, H), siendo mayor en ninfas en todos los casos. Al investigar entre qué estados radicaron esas diferencias, encontramos que en todos los cultivos hubo diferencias entre las ninfas y adultos ápteros ( $p < 0.05$ ) excepto en cultivo de *B. oleracea* var. *botrytis* del año 2010 ( $p > 0.05$ ) (Tabla 3.2) (Fig. 3.8 A, B, E, F, G, H). En el caso de la comparación entre ninfas y adultos alados en todos los cultivos existieron diferencias significativas excepto en los cultivos de *B. oleracea* var. *italica* de estación primavera-verano y en *L. sativa* ( $p > 0.05$ ). (Fig. 3.8 B, C, E, F, H). Mientras que entre adultos ápteros y adultos alados en el único cultivo en el que no se detectaron diferencias significativas fue *B. oleracea* var. *botrytis* del año 2011 ( $p > 0.05$ ) (Tabla 3.2) (Fig. 3.8 A, B, C, E, F, G, H).

Al estudiar el riesgo de infección entre estadios de desarrollo encontramos que en *L. sativa*, el riesgo de que se infectaran ninfas fue mayor que el riesgo que se infecten adultos ápteros (2.25 veces más riesgo que se infecten ninfas que ápteros). Y en el mismo cultivo el riesgo que se infecten adultos alados fue 2.67 veces más que el riesgo que se infecten ninfas (Tabla 3.2). De manera semejante, en *B. oleracea* var. *capitata*, el riesgo de que se infecten ninfas fue 1.55 veces más que el riesgo que se infecten ápteros mientras que el riesgo de que se infecten adultos alados fue 10.73 veces más que el riesgo de infección de ninfas (Tabla 3.2).

En otros cultivos fueron mayores los riesgos de infección de adultos ápteros y de adultos alados en relación al riesgo de infección de ninfas, este es el caso de *B. oleracea* var. *botrytis* del 2010, en el que el riesgo que se infecten ápteros y alados fue 1.17 y 18.91 veces más que el riesgo que se infecten ninfas respectivamente (Tabla 3.2); y de *B. oleracea* var. *italica* de estación otoño-invierno en el que el riesgo que se infecten ápteros y alados fue 1.66 y 5.99 veces más que el riesgo que se infecten ninfas, respectivamente (Tabla 3.2).

En el caso de *B. oleracea* var. *italica* de estación primavera-verano el riesgo de infección de ápteros fue 1.84 veces más que el riesgo de infección de ninfas y por otro lado el riesgo de infección de ninfas fue mayor que el riesgo de infección de alados (1.62) (Tabla 3.2).

Cuando se compararon los riesgos de infección entre los adultos ápteros y adultos alados, encontramos que el riesgo de infección de adultos alados fue 16.05; 2.67; 16.66 y 3.60 veces más que el riesgo que se infecten adultos ápteros en cultivos de *B. oleracea* var. *botrytis* del año 2010, *L. sativa*, *B. oleracea* var. *capitata* y *B. oleracea* var. *italica* de estación otoño-invierno respectivamente (Tabla 3.2). En el único cultivo en el que el riesgo de que se infecten ápteros fue mayor (2.99 veces mayor) que el de alados fue en *B. oleracea* var. *italica* de estación primavera-verano (Tabla 3.2).

En *S. melongena* hubo 1.8 y 1.4 más veces de riesgo de infección de ninfas que de adultos ápteros ( $p < 0.05$ ) y de adultos alados ( $p < 0.05$ ), respectivamente (Tabla 3.2). En *C. annuum*, el riesgo de infección de ninfas fue 0.8 y 1.4 veces más importante que el riesgo de infección de ápteros ( $p < 0.05$ ) y de alados ( $p < 0.05$ ), respectivamente (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Resultados estadísticos de la asociación entre la densidad de la población hospedadora y el número de áfidos infectados, de la comparación en el número de áfidos infectados entre estadios de desarrollo y entre fechas de observación y del riesgo de infección entre estadios de desarrollo.

Cultivo	Regresión lineal	Comparación entre estadios de desarrollo			Regresión logística		Comparación entre fechas de muestreo	
		Chi cuadrado	Estadios	Signif.	Riesgo	Signif.	Chi cuadrado	Signif.
<i>L. sativa</i>	0.090	0.000	N y aa	0.002	2.25	0.001	45.79	0.000
			N y al	0.096	0.37	0.002		
			Aa y al	0.001	0.16	0.106		
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.307	0.000	N y aa	0.034	1.55	0.000	88.39	0.000
			N y al	0.000	0.09	0.034		
			Aa y al	0.000	0.05	0.000		
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> 2010	0.167	0.000	N y aa	0.063	0.84	0.001	97.14	0.000
			N y al	0.000	0.05	0.393		
			Aa y al	0.000	0.06	0.000		
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> 2011	0.32	0.423	N y aa	0.212	-	-	185.65	0.000
			N y al	0.863	-	-		
			Aa y al	0.405	-	-		
<i>S. melongena</i>	0.83	0.000	N y aa	0.000	1.8	0.000	3213.67	0.000
			N y al	0.002	1.4	0.000		
			Aa y al	0.017	0.70	0.002		
<i>C. annuum</i>	0.37	0.000	N y aa	0.000	0.8	0.000	7190.26	0.000
			N y al	0.006	1.4	0.000		
			Aa y al	0.000	0.53	0.006		
<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> estación verano	0.108	0.000	N y aa	0.000	0.54	0.000	2094.07	0.000
			N y al	0.338	1.62	0.000		
			Aa y al	0.026	2.99	0.342		
<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> estación invierno	0.345	0.000	N y aa	0.002	0.60	0.000	159.37	0.000
			N y al	0.000	0.16	0.002		
			Aa y al	0.000	0.27	0.000		

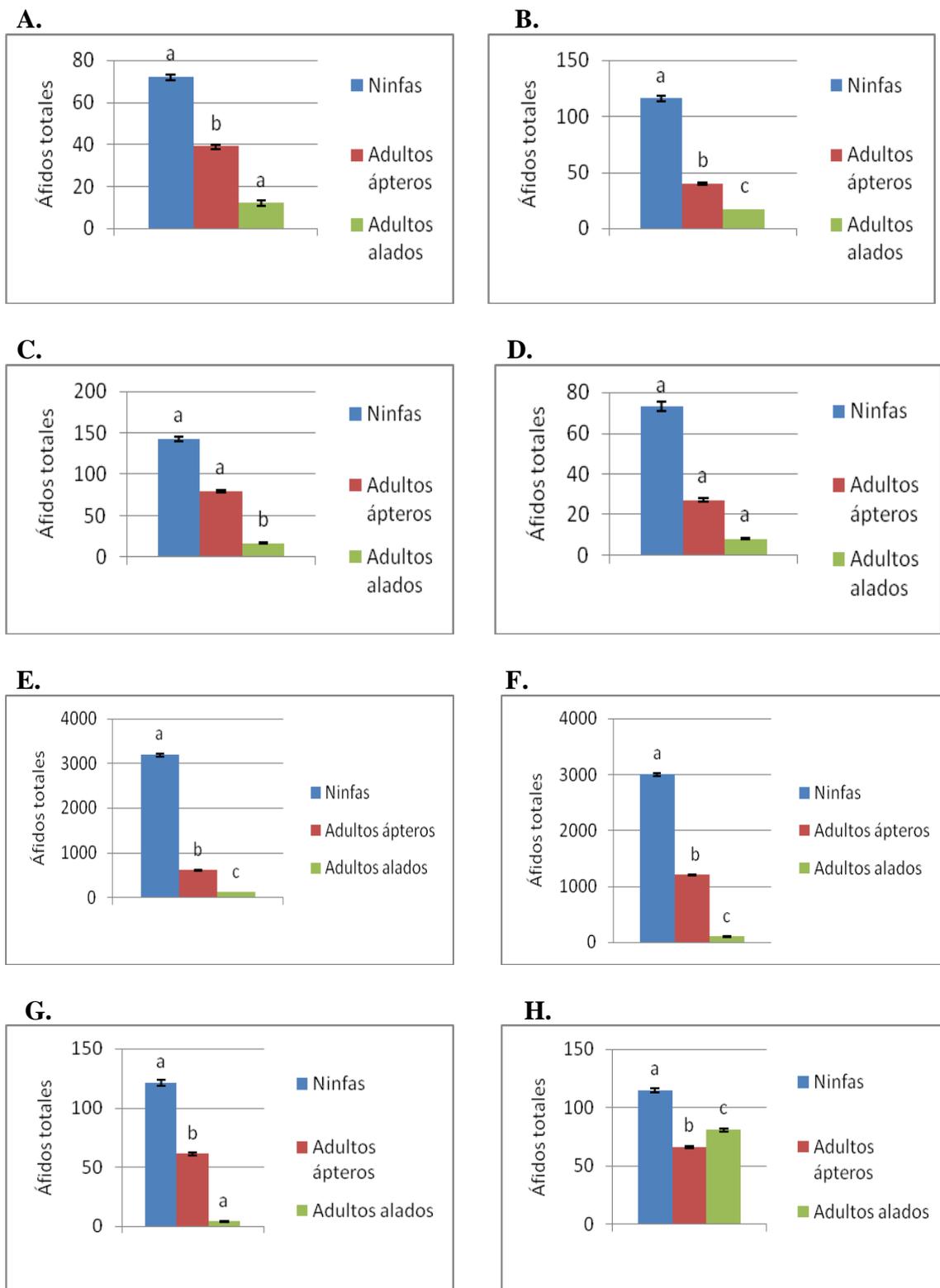


Figura 3.8: Abundancia de ninfas, adultos ápteros y adultos alados infectados en cultivos de A. *L. sativa*. B. *B. oleracea* var. *capitata*. C. *B. oleracea* var. *botrytis* 2010. D. *B. oleracea* var. *botrytis* 2011. E. *S. melongena*. F. *C. annuum*. G. *B. oleracea* var. *italica* estación primavera-verano. H. *B. oleracea* var. *italica* estación otoño-invierno. Letras seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Relación del número de áfidos infectados con la temperatura y la humedad relativa

Con el objetivo de evaluar si las variables ambientales temperatura y humedad relativa tuvieron efecto en la ocurrencia de áfidos infectados, se aplicó para cada cultivo un modelo lineal general univariante que proporcionó información acerca de la significancia o no de estas variables independientes sobre la variable respuesta.

En seis de los ocho cultivos estudiados, la temperatura apareció como un factor de significancia ( $p < 0.05$ ) determinando la aparición de infecciones fúngicas. Únicamente *S. melongena* y *B. oleracea* var. *italica* de estación otoño-invierno esta variable no fue significativa ( $p > 0.05$ ). En cuanto a la humedad relativa, en cuatro de los ocho cultivos (*L. sativa*, *B. oleracea* var. *capitata*, *C. annuum*, *B. oleracea* var. *italica* estación primavera-verano) se observó un efecto de esta variable en el número de áfidos infectados ( $p < 0.05$ ). Por último, en tres (*L. sativa*, *C. annuum* y *B. oleracea* var. *italica* de estación primavera-verano) de los ocho cultivos estudiados, la interacción entre humedad y temperatura fue significativa ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Estadísticos correspondientes al MLG univariante construido para cada uno de los cultivos estudiados.

Cultivo	Fuentes de variación	Suma de cuadrados Tipo III	gl	F	Sig.
<i>L. sativa</i>	Temperatura	13.20	1	3.22	0.07
	Humedad	41.08	1	10.04	0.002
	Temp*Hum.	26.04	1	6.36	0.01
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Temperatura	37.60	1	4.80	0.03
	Humedad	16.87	1	2.15	0.14
	Temp*Hum.	-	-	-	-
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> 2010	Temperatura	64.12	1	5.82	0.01
	Humedad	10.41	1	0.94	0.3
	Temp*Hum.	5.15	1	0.46	0.4
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> 2011	Temperatura	41.17	1	4.18	0.04
	Humedad	5.04	1	0.51	0.47
	Temp*Hum.	-	-	-	-
<i>S. melongena</i>	Temperatura	229.49	1	0.17	0.67
	Humedad	2652.94	1	2.05	0.15
	Temp*Hum.	1698.82	1	1.31	0.25
<i>C. annuum</i>	Temperatura	22561.57	1	15.75	0.000
	Humedad	89452.06	1	62.45	0.000
	Temp*Hum.	22325.55	1	15.58	0.000
<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> estación primavera-verano	Temperatura	175.65	1	16.41	0.000
	Humedad	125.60	1	11.73	0.001
	Temp*Hum.	167.31	1	15.63	0.000
<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> estación otoño-invierno	Temperatura	1.48	1	0.26	0.60
	Humedad	2.77	1	0.48	0.48
	Temp*Hum.	1.84	1	0.32	0.56

*Presencia de otros enemigos naturales*

En la mayoría de los cultivos se han registrado parasitoides y/o depredadores como agentes de control biológico. Es así que en lechuga fueron registradas al menos 3 especies de coccinélidos (Coleoptera: Coccinellidae), en pimiento se han observado huevos de crisópidos (Fig. 3.9) en el envés de hojas. En cultivo de berenjena se han registrado también coccinélidos en distintos estadios de desarrollo y con importante frecuencia se han observado polinizadores cuando el cultivo se encontraba en estadio de floración. En cultivos de crucíferas fue común la observación de parasitoides, y en muchas ocasiones estos fueron hallados en simultáneo con la ocurrencia de micosis de hongos entomophthorales.

Es importante señalar que aún habiéndose encontrado enemigos naturales en simultáneo con el desarrollo de epizootias no se han observado parasitoides o depredadores infectados con hongos entomophthorales.

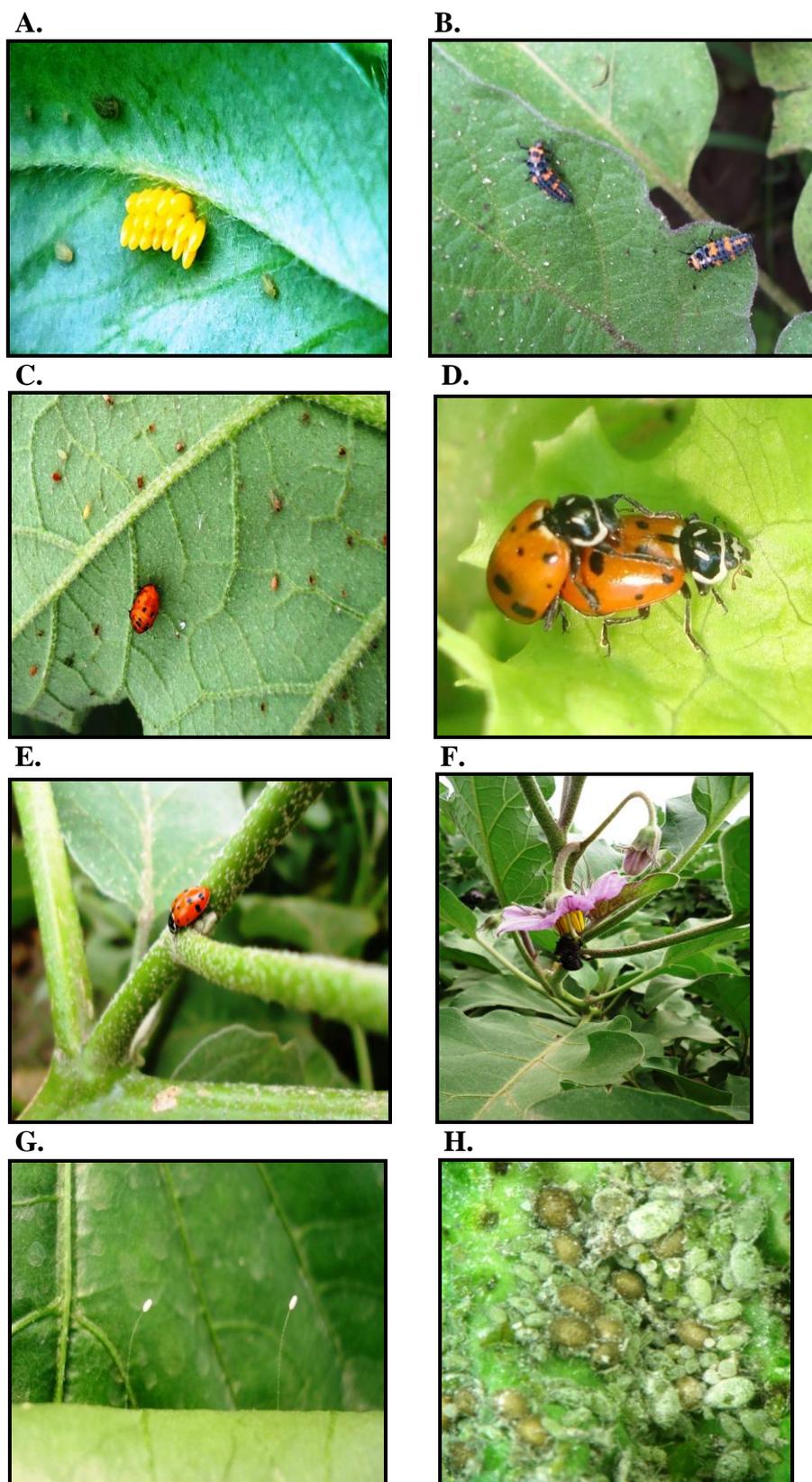


Fig. 3.9: Presencia de enemigos naturales en cultivos hortícolas. A. Huevos de Coccinellidae. B. Estados larvales y C. Estado de pupa de Coccinellidae. D-E. Estados adultos de distintas especies de Coccinellidae. F. Polinizador en flor de *S. melongena*. G. Huevos de Chrysopidae. H. Parasitoides de *B. brassicae*.

## DISCUSIÓN

En nuestro país son escasos los registros de hongos entomophthorales como patógenos de áfidos en cultivos hortícolas. Los pocos antecedentes están restringidos a estudios realizados en la provincia de Buenos Aires.

De manera similar a lo registrado en este estudio, *E. planchoniana*, *Z. radicans*, *P. neoaphidis* y *Zoophtora* sp. han sido previamente registrados como patógenos de varias especies de áfidos (Hemiptera: Aphididae) en la provincia de Buenos Aires (Lopez Lastra y Scorsetti, 2006) (Scorsetti *et al.*, 2006). Asimismo Scorsetti *et al.* (2010) registraron *P. neoaphidis* en *N. ribisnigri* en cultivo de lechuga con una prevalencia de 56.6% (n = 30). El rango de infecciones fúngicas registrados durante el presente estudio en los cultivos hortícolas estuvo comprendido entre 1.8 % (n=1128) (registrado en cultivo de brócoli de estación primavera-verano) y 98.1 % (n=3212) registrado en pimiento, siendo el menor y mayor porcentaje de infección respectivamente.

En el presente estudio, *P. neoaphidis* y *E. planchoniana* fueron registrados causando epizootias en *M. persicae* alcanzando niveles de 45.5% (n = 2296) y 98.1 % (n = 15) en *S. melongena* y en *C. annuum*, respectivamente. Estas especies de hongos parecen desempeñar un rol en la disminución de las poblaciones de áfidos de *M.persicae*. Es notable destacar que las epizootias ocurrieron entre los meses de octubre-febrero (primavera y verano en Argentina). *Pandora neoaphidis* aparentemente infecta áfidos más frecuentemente en zonas templadas (Keller, 1991) y ha sido citada causando epizootias en *M. persicae* sobre espinaca en Arkansas (McLeod *et al.* 1998) mientras *E. planchoniana* es más frecuente en hábitats secos (Keller, 1987; Bałazy, 1993). Por otro lado también se han observado en este estudios frecuentes epizootias de *Z. radicans* en *B. brassicae* alcanzando niveles de hasta el 96 % (n=75) en *B. oleracea* var. *botrytis* durante el año 2011.

En estudios previos referidos a la estacionalidad de hongos entomophthorales en poblaciones de insectos en Argentina fue observado que las infecciones fúngicas fueron más comunes en la estación otoño-invierno (desde marzo hasta agosto) (López Lastra *et al.* 2003, 2006; Toledo *et al.* 2008). Sin embargo, estos registros no corresponden a áfidos sino a otros insectos, tales como larvas de dípteros acuáticos y chicharritas. En

base a los resultados obtenidos en este estudio podríamos afirmar que las infecciones de hongos entomophthorales en áfidos ocurren con mayor frecuencia y con mayor intensidad en la estación otoño-invierno, cuando prevalecen condiciones de temperaturas relativamente bajas y porcentajes de humedad elevados. Los mayores porcentajes de infección en cada uno de los cultivos estudiados en la presente tesis, ocurrieron con porcentajes de HR de entre 67 y 89 % y un rango de temperatura de 6.6 y 25.8°C. La comparación entre los mayores niveles de infección observados en cada cultivo evidenció que la transmisión de los hongos patógenos en las poblaciones de áfidos estuvo influenciada por las variables ambientales. Los menores porcentajes de infección se cuantificaron en *S. melongena* y *B. oleracea* var. *italica*, ambos correspondientes a la estación primavera-verano, mientras que los mayores porcentajes de infección fueron registrados en cultivos de otoño-invierno.

La comparación establecida en dos cultivos de *B. oleracea* var. *italica* entre las distintas estaciones (primavera-verano y otoño-invierno) permitió apartar del análisis variables como tipo de cultivo, o especie de áfido hospedador, corroborando que las condiciones de temperatura y humedad relativa fueron los factores más importantes como determinantes de los niveles de infección. En *B. oleracea* var. *italica* de estación otoño-invierno el mayor porcentaje de infección observado fue muy superior al observado en el mismo cultivo pero de estación primavera-verano.

Estudios realizados en cultivos convencionales de lechuga en la provincia de Buenos Aires, Argentina, registraron una prevalencia máxima de 28.5% (n = 4) (Scorsetti, datos no publicados) comparados con cultivos orgánicos en que registraron una prevalencia de 56.6% (n = 30) (Scorsetti et al. 2010). Los autores también informaron que el número de áfidos fue menor en cultivos convencionales que en orgánicos. Los activos químicos aplicados a los cultivos pueden afectar a la transmisión de los hongos patógenos de áfidos (Steinkraus, 2006). Los insecticidas químicos podrían alterar la dinámica de transmisión de hongos patógenos al reducir las poblaciones de áfidos a una baja densidad y esto podría afectar el potencial para la transmisión y el desarrollo de epizootias. En este estudio, en general, los insecticidas redujeron la densidad de áfidos durante las primeras semanas. Karner *et al.* (1997) registraron que los insecticidas disminuyeron el número de áfidos por unos pocos días y luego, en algunos casos, resultó en un incremento de las poblaciones. Respecto a los

fungicidas, varios autores indicaron que pueden suprimir el desarrollo de epizootias de los hongos entomopatógenos (Kish and Allen, 1978; Ruano-Rossil *et al.* 2002; Smith and Hardee, 1993; Wells *et al.* 2000). Epizootias de *P. neoaphidis* y de *E. planchoniana* en *M. persicae* y de *Z. radicans* en *B. brassicae*, ocurrieron aún con aplicaciones de insecticidas y fungicidas, lo que nos permite suponer que los químicos no inhibirían por completo la actividad fúngica. Debido al complejo de interacciones y composición de los agroecosistemas, las aplicaciones de insecticidas y fungicidas sintéticos no necesariamente actuarían en detrimento de la ocurrencia de hongos entomopatógenos. Algunos compuestos selectivos podrían posiblemente ser usados en programas de manejo integrado de plagas (Mietkiewski *et al.* 1997).

La densidad de la población hospedadora ha sido considerada como el principal factor que controla los niveles de infección en algunos sistemas cultivo-áfido-patógeno (Feng *et al.* 1992; Rabasse and Robert, 1975; Robert *et al.* 1973; Soper and MacLeod, 1981; Wilding and Perry, 1980). En este estudio, este factor explicó el 83% de la variabilidad en infestaciones en berenjena. Sin embargo, en el resto de los cultivos el valor de  $R^2$  fue muy bajo (Tabla 3.2), por lo que no es posible establecer relación entre esas variables. Scorsetti *et al.* (2010) encontraron que el 66% de la variabilidad en la infectividad de *P. neoaphidis* fue explicada por la densidad de los áfidos sanos.

En la mayoría de los cultivos se encontraron diferencias en el número de áfidos infectados entre ninfas y adultos. El número de ninfas infectadas fue significativamente mayor en relación a los números de ápteros y de alados (Fig. 3.8 A-H). Los resultados muestran que la mayoría de la población hospedadora estuvo conformada por ninfas. De acuerdo con Steinkraus (2006), poblaciones densas de ninfas con frecuencia podrían favorecer la rápida propagación de los hongos patógenos. Scorsetti *et al.* (2010) encontraron que *N. ribisnigri* fue igualmente susceptible a la enfermedad fúngica a lo largo de su ciclo de vida. Kim y Roberts (2012) sugirieron que los estadios ninfales tempranos de áfidos del algodón pueden escapar a la infección fúngica debido, al menos en parte, a la combinación de tres factores: bajo número de conidios adheridos a sus cutículas, bajos niveles de germinación de conidios y rápida muda, factores que actuarían favoreciendo la expulsión de los conidios antes de que su tubo germinativo penetrara dentro de la hemolinfa del hospedador.

En relación a la presencia de insectos benéficos como agentes de control biológico en cultivos hortícolas, es importante destacar la característica de especificidad de los hongos entomophthorales la cual hace factible la utilización de estos organismos en programas de manejo integrado de plagas, ya que no afectarían la ocurrencia de parasitoides y/o depredadores. Si bien Díaz *et al.* (2010) han citado la ocurrencia de infecciones de hongos entomophthorales en larvas de sírfidos, es importante destacar que estos resultados fueron obtenidos en condiciones experimentales no habiendo sido registrado ningún antecedente de ocurrencia natural de infecciones causadas por hongos entomophthorales en organismos benéficos en condiciones de campo.

A close-up photograph of a plant stem, likely a corn cob, showing a ladybug (Coccinella septempunctata) and several aphids. The ladybug is positioned on the stem, and the aphids are clustered around it. The background is a soft-focus green, suggesting a natural outdoor setting.

**CAPÍTULO IV: Potencial de los Hongos  
Entomophthorales en estrategias de Control  
Biológico Conservativo<sup>3</sup>**

---

<sup>3</sup> Resultados parciales de este Capítulo fueron publicados en la Revista “International Journal of Pest Management”, ver: Manfrino et al. 2013.

## INTRODUCCIÓN

El Control Biológico Conservativo (CBC) es una estrategia de control biológico en la que prácticas de manejo son alteradas para incrementar las condiciones de vida de los enemigos naturales de las plagas (Barbosa, 1998; Eilenberg *et al.*, 2001). Una práctica común del CBC es la diversificación del agroecosistema a través del establecimiento y conservación de plantas de crecimiento espontáneo que bordean el cultivo. Sin embargo, esta vegetación es considerada como maleza en muchos casos y la lucha contra estas plantas indeseables adquiere día a día mayor importancia en nuestro país. El término maleza tiene una connotación negativa y se define como “aquellas plantas que llegan a ser perjudiciales o indeseables en determinado lugar y en cierto tiempo” (Marzocca, 1976). Numerosos estudios reconocen la importancia de determinadas especies vegetales de crecimiento espontáneo que, al ser correctamente manejadas en los agroecosistemas, cumplen funciones claves como reservorios de insectos benéficos, por lo que no se las debería considerar como perjudiciales.

Las condiciones que debe reunir una especie vegetal para que pueda ser utilizada como hospedera alternativa de pulgones y de enemigos naturales son, básicamente que esta especie no compita con las plantas cultivadas por los recursos del agroecosistema; que no albergue especies de insectos que constituyan plagas para los cultivos, al menos que no integre un hospedador habitual o alternativo para los mismos; y que las especies de insectos que viven en ella tengan las mismas especies de parasitoides, depredadores y patógenos que los que constituyen plagas en las plantas cultivadas que se pretenden proteger (Tizado Morales *et al.*, 1992). Entre las especies vegetales que presentan las condiciones mencionadas con anterioridad y que por ello no se las puede considerar como malezas, Bertolaccini *et al.* (1993) mencionan, para el área central de la provincia de Santa Fe, *F. vulgare*, *S. oleraceus*, *Taraxacum officinalis* (L.), *Brassica campestris* (L.), *Cirsium vulgare* (L.), *Conyza bonariensis* (L.), *Baccharis pingraea* (L.), *Aster squamatus* (Spreng) y *Ammi majus* L. En el mismo trabajo estas especies vegetales fueron consideradas importantes por la cantidad y la variedad de agentes de biocontrol registrados. Asimismo, la evidencia indica que ciertos vegetales (principalmente Umbelliferae, Leguminosae y Compositae) juegan un importante rol ecológico al acoger a un complejo de artrópodos benéficos que ayudan en el control de las poblaciones de plagas (Altieri *et al.*, 1977; Altieri y Whitcomb, 1979, 1980). Debido a ello, no siempre se las debería considerar como perjudiciales, ya que esta vegetación influye en la

abundancia y en la diversidad de insectos herbívoros y sus enemigos naturales asociados en sistemas de cultivos. Manfrino *et al.* (2011) han registrado depredadores, parasitoides y hongos entomopatógenos en *F. vulgare*, *C. bonariensis*, *L. amplexicaule*, *A. majus* y *C. bursa pastoris*, y destacan la importancia de mantener la vegetación de crecimiento espontáneo en bordes de cultivos en la provincia de Santa Fe.

Las plantas no cultivadas pueden ser un factor clave en promover la supervivencia, reproducción y actividad de los enemigos naturales de los áfidos y, pueden también actuar como reservorios para hongos entomopatógenos (Albrecht 2003; Wackers 2004; Asteraki *et al.* 2004; Wratten *et al.* 2002; Pell *et al.* 2010).

Hasta la fecha, la mayoría de los ejemplos de CBC se relacionan con artrópodos como enemigos naturales (Landis *et al.* 2000; Gurr *et al.* 2004; Wade *et al.* 2008; Zumoffen *et al.* 2012) con pocos estudios relacionados a entomopatógenos (Fuxa 1998; Ekesi *et al.* 2005). El CBC con hongos entomopatógenos incluye la manipulación de ambos, el ambiente del cultivo y los hábitats situados fuera del cultivo (Pell *et al.* 2010).

En este estudio se propuso estudiar la composición de los bordes de cultivos de trigo en dos localidades de la provincia de Santa Fe y evaluar el rol de esta vegetación como refugio para hongos patógenos de áfidos.

La producción de trigo es generalmente caracterizada por amplias áreas cultivadas donde los costos de los insumos para la protección del cultivo son una limitación para la obtención de beneficios. Las plantas no cultivadas que crecen junto a los bordes de campos de trigo pueden actuar como hospedadores alternativos para áfidos no plaga (Shah & Pell, 2003) que, indirectamente proveen un servicio ecosistémico por incrementar el impacto de los enemigos naturales en los áfidos plaga.

Entre los hongos entomopatógenos, el Orden de los Entomophthoromycota ofrece un alto potencial para explotar en estrategias de CBC contra áfidos (Ekesi *et al.*, 2005; Shah & Pell, 2003; Steinkraus, 2006; Keller & Suter, 1980; Powell *et al.*, 1986; Steenberg & Eilenberg, 1995; Barta y Cagáñ, 2003). La importancia de estos organismos como enemigos naturales de áfidos reside en su habilidad para suprimir las poblaciones de áfidos con condiciones de humedad y frío, en contraste con los requerimientos para la actividad de parasitoides y depredadores (Pell, 2007). Estudios

del rol de hospedadores alternativos como recursos de inóculo fúngico han sido realizados en Europa (Pell, 2007; Carruthers y Soper, 1987; Eilenberg, 1988; Nielsen *et al.*, 2001; Powell *et al.*, 2003) y en África (Hatting *et al.*, 1999). Hasta la fecha, sin embargo, no se han realizado estudios relacionados a CBC con entomopatógenos en Sudamérica.

En Suiza, *P. neoaphidis* y *C. obscurus* fueron registrados para múltiples especies de áfidos sin importancia económica en hierbas adyacentes a cultivos anuales (Keller & Suter, 1980). Powell *et al.* (1986) encontraron que hongos entomofthorales fueron más comunes en los bordes de cultivos, donde áfidos hospedadores alternativos estuvieron presentes y el conjunto de malezas proporcionaron un mejor ambiente para la transmisión de hongos que el cultivo de trigo por sí solo. Las especies patógenas de áfidos también pueden hibernar en éstos áfidos hospedadores en plantas de cobertura y bordes forestales (Hall *et al.*, 1992).

## OBJETIVOS

- Identificar potenciales asociaciones de plantas-áfidos-hongos como potenciales reservorios de hongos entomofthorales.
- Determinar los niveles de infecciones fúngicas en el cultivo de trigo y en las hospederas asociadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estudio a campo

El estudio cubrió el oeste de la provincia de Santa Fe, en la región pampeana argentina. Los muestreos abarcaron dos localidades: Rafaela (31°11'16.02''S/61°30'20.40''O) y Monte Vera (31°32'49.79''S/60°41'33.89''O). Los estudios fueron realizados semanalmente en bordes de cultivos de trigo desde abril del 2010 hasta abril del 2012. En cada fecha de muestreo, cinco individuos de cada especie de planta fueron aleatoriamente seleccionados y muestras de áfidos sanos y vivos fueron recolectados para proceder a su identificación de acuerdo a la metodología detallada en materiales y métodos generales. A fin de calcular la prevalencia de hongos entomofthorales en las poblaciones de áfidos, pulgones sanos e infectados fueron cuantificados una vez al mes. Áfidos infectados fueron identificados de acuerdo a la

metodología descrita en el Capítulo I. Las especies de plantas fueron identificadas por especialistas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

## RESULTADOS

Fueron identificadas trece especies de plantas en ambas localidades muestreadas (Tabla 4.1). Ocho especies de áfidos fueron identificados desde estas plantas. *Hyperomyzus carduellinus* fue la especie de áfido más abundante y fue registrado sobre *S. oleraceus* (Tabla 4.1). En Rafaela, áfidos infectados fueron registrados en las siguientes especies de plantas: *L. amplexicaule* (Lamiaceae), *M. brachystephana* (Apocynaceae), *F. vulgare* (Apiaceae), *S. oleraceus* (Asteraceae) y *M. sylvestris* (Malvaceae), mientras que en Monte Vera las especies de plantas hospedadoras incluyeron: *B. rapa* (Brassicaceae), *S. oleraceus*, *A. cristata* (Malvaceae) *M. sylvestris* y *C. bursa-pastoris* (Brassicaceae) (Tabla 4.1). Las especies de hongos identificadas desde los áfidos hospedadores de estas plantas incluyeron: *P. neoaphidis*, *Z. radicans* y *E. planchoniana*. Preparados permanentes y material seco preservado fueron depositados en la Colección Micológica del CEPAVE.

Tabla 4.1: Listado de especies de plantas identificadas en los bordes de cultivos de trigo en Rafaela y en Monte Vera.

Familia de planta	Especie hospedadora	Rafaela	Monte Vera
BRASSICACEAE	<i>Brassica rapa</i> L.	x	x
	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L. Medik.)	x	x
ASTERACEAE	<i>Sonchus oleraceus</i> (L.)	x	x
	<i>Conyza bonariensis</i> (L.)	x	x
	<i>Cichorium intybus</i> L.	x	x
	<i>Taraxacum officinale</i> Weber	x	x
APIACEAE	<i>Ammi majus</i> (L.)	x	x
	<i>Foeniculum vulgare</i> (Miller)	x	
LAMIACEAE	<i>Lamium amplexicaule</i> L.	x	x
SCROPHULARIACEAE	<i>Verbascum</i> L.	x	
APOCYNACEAE	<i>Morrenia brachystephana</i> Griseb	x	
MALVACEAE	<i>Malva silvestris</i> L.		x
	<i>Anoda cristata</i> (L.)		x

*Pandora neoaphidis* fue registrado desde *B. brassicae*, *Aphis* sp., *A. gossypii*, *H. carduellinus*, *U. sonchi*, *C. korschelti*, *A. nerii* y *M. persicae* (Tabla 4.2). *Pandora neoaphidis* fue observado causando infecciones de hasta el 70% en *H. carduellinus*. El mayor porcentaje de infección fue registrado en esta especie de áfido el 21 de octubre del 2011 (Tabla 4.2). *Zoophthora radicans* fue identificado entre las especies de áfidos: *C. korschelti*, *H. carduellinus*, *D. apiifolia*, *M. persicae* y *Aphis* sp. Los mayores porcentajes de infección de *Z. radicans* fueron registrados para *Aphis* sp. y *C. korschelti* en *C. bursa pastoris* y *L. amplexicaule*, respectivamente (Tabla 4.2). *Entomophthora planchoniana* fue identificado únicamente desde *C. korschelti* en *L. amplexicaule* y fue registrado solamente durante el mes de septiembre del 2010 (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Ocurrencia y prevalencia de hongos entomofthorales identificados desde áfidos hospedadores en la vegetación asociada a bordes de cultivos en Rafaela y en Monte Vera.

Especie fúngica	Especie de áfido	Fecha de recolección	Prevalencia (%) y n total (entre paréntesis)	Localidad	Especie de planta
<i>Pandora neoeaphidis</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i>	May 09, 2011*	20.5 (161)	Monte Vera	<i>Brassica rapa</i>
		Jul 08, 2011	-		
	<i>Aphis</i> sp.	Jun 24, 2011	-		<i>Anoda cristata</i>
		May 09, 2011*	19.1 (47)		
		Jul 01, 2011*	11.8 (17)		<i>Capsella bursa-pastoris</i>
		Jul 08, 2011	-		
	<i>Aphis gossypii</i>	Jun 24, 2011*	19.2 (26)		
		May 27, 2011	-		
		Jun 24, 2011*	43.1 (350)		
		<i>Hyperomyzus</i>	Jul 01, 2011*		39.3 (247)

<i>carduellinus</i>	Oct 21, 2011*	73.9 (88)	Rafaela	<i>Sonchus oleraceus</i>
	May 27, 2010*	15.7 (70)		
	May 12, 2011	-		
	Oct 13, 2011	-		
	Oct 14, 2011	-		
	Oct 18, 2011*	58 (100)		
<i>Uroleucon sonchi</i>	Jun 24, 2011*	10.3 (39)	Monte Vera	
	Nov 01, 2010*	12.5 (40)	Rafaela	
<i>Cryptomyzus korschelti</i>	Jun 09, 2010*	17.6 (34)	Rafaela	<i>Lamium amplexicaule</i>
	Jul 05, 2010	-		
	Sep 20, 2010	-		
	May 26, 2011	-		
	Jun 23, 2011*	35.6 (101)		
	Jul 12, 2011	-		
	Aug 17, 2011*	11.7 (128)		
<i>Aphis nerii</i>	Jun 09, 2010*	0.6 (164)		<i>Morrenia brachystephana</i>
<i>Myzus persicae</i>	Aug 17, 2011*	15.2 (66)		<i>Malva sylvestris</i>
<i>Cryptomyzus korschelti</i>	Jul 05, 2010*	21.8 (55)	Rafaela	<i>Lamium amplexicaule</i>
	Aug 17, 2011*	20.2 (89)		

<i>Zoophthora Radicans</i>	<i>Myzus persicae</i>	Aug 17, 2011*	4 (50)	Monte Vera	<i>Malva sylvestris</i>
		Jun 10, 2012*	4.6 (43)		
	<i>Hyperomyzus carduellinus</i>	May 27, 2010*	14.4 (201)	Rafaela	<i>Sonchus oleraceus</i>
		Jul 17, 2011	-		
					<i>Foeniculum vulgare</i>
	<i>Dysaphis apiifolia</i>	Jul 21, 2010*	0.6 (170)		
	<i>Aphis</i> sp.	Jul 01, 2011*	22.4 (58)	Monte Vera	<i>Capsella bursa-pastoris</i>
<i>Entomophthora planchoniana</i>	<i>Cryptomyzus korschelti</i>	Sep 14, 2010*	24 (75)	Rafaela	<i>Lamium amplexicaule</i>

No se registraron infecciones fúngicas desde áfidos recolectados ya sea en plantas no cultivadas o de trigo en Monte Vera durante el año 2010. Sin embargo, durante el segundo año de observaciones áfidos infectados fueron registrados desde malezas asociadas a los bordes de cultivos de trigo desde mayo hasta julio, mientras en trigo, el único registro de infecciones de hongos entomofitales fue el de *Z. radicans* en octubre de 2011 (Manfrino *et al.*, 2014). En Rafaela, infecciones naturales de áfidos en trigo y en plantas no cultivadas ocurrieron desde mayo hasta octubre en 2010 y en 2011.



Fig. 4.1: Plantas de crecimiento espontáneo en bordes de cultivos de trigo. A. *Capsella bursa-pastoris*. B. *Brassica rapa*. C. *Sonchus oleraceus*. D. *Lamium amplexicaule*.

## DISCUSIÓN

### Plantas hospedadoras y sus áfidos asociados

Estudios de las asociaciones entre áfidos, sus plantas hospedadoras y hongos antagonistas son críticos en la implementación del CBC. Idealmente, estas especies de plantas no deberían ser hospedadores naturales de áfidos que podrían constituir un potencial peligro para el cultivo. Cómo los géneros de áfidos tienden a estar asociados con Familias particulares de plantas, cada especie dentro de un género tiende a restringir su alimentación a ciertos géneros o especies de plantas hospedadoras, o al menos a ciertas especies de plantas dentro de un claramente definido grupo de géneros (Blackman y Eastop, 2000).

A nivel mundial, *A. nerii* fue registrado como hospedador de *M. brachystephana* principalmente en Apocynaceae (Blackman y Eastop, 2000). En Argentina, esta especie fue reconocida en la Familia Asclepiadaceae (Nieto Nafría *et al.*, 1994). *Brevicoryne brassicae* es registrada en *B. rapa*, y esta especie de áfido se alimenta únicamente en plantas de crucíferas (Blackman y Eastop, 2000), por lo tanto la presencia de este áfido en plantas no cultivadas en los márgenes de cultivos de trigo no debería representar ningún potencial peligro para el cultivo. De las ocho especies del género *Brevicoryne*, únicamente *B. brassicae* fue registrado para América del Sur incluyendo Argentina (Nieto Nafría *et al.*, 1994). *Dysaphis apiifolia* fue identificada desde *F. vulgare*, éste pulgón tiene a *Crataegus* como hospedador primario. Poblaciones anolocíclicas viven en *Apium graveolens*, *F. vulgare*, *Petroselinum sativum*, y otras plantas pertenecientes a las Umbelíferas. Nieto Nafría *et al.* (1994) registran la especie en *F. vulgare* en Córdoba, Argentina. Especies pertenecientes a Familia Umbelliferae cumplen un importante rol ecológico ya que actúan como reservorios de especies de artrópodos benéficos que pueden contribuir al control de poblaciones de insectos plaga (Altieri, 1992). Colonizando *L. amplexicaule* fue registrada la especie *C. korschelti*. Aproximadamente 17 especies de *Cryptomyzus* Oestlund son asociadas con *Ribes* y/o Labiatae. *Cryptomyzus korschelti* fue registrado en todo el mundo en *Lamium* spp. (Blackman y Eastop, 2006). No obstante, en Argentina, no hay registros de esta especie de áfido y no se conoce nada acerca de sus plantas hospedadoras. Existe un único registro de *C. michaelsoni* (Schouteden) en Tierra del Fuego (Nieto Nafría *et al.*, 1994). En *S. oleraceus* dos especies de áfidos fueron

identificadas: *H. carduellinus* y *U. sonchi*. Aproximadamente 18 especies de *Hyperomyzus* Börner son asociadas con *Ribes* como hospedador primario, mientras que hospedadores secundarios los constituyen plantas de la Familia Compositae (Blackman y Eastop, 2006). Dos especies de este género fueron registrados para América del Sur: *H. carduellinus* e *Hyperomyzus lactucae* (L.). *Hyperomyzus carduellinus* ha sido registrado en *S. oleraceus* en Argentina (Nieto Nafría *et al.*, 1994), como fue confirmado en nuestro estudio. *Uroleucon* Mordvilko es un Género que comprende cerca de 180 especies, de las cuales 160 viven en plantas Compuestas, 11 en Campanulaceae y nueve especies fueron descritas desde otras especies de plantas. *Uroleucon sonchii* es registrado principalmente para *Sonchus* y para *Lactuca* y *Cichorium* (Blackman y Eastop, 2000). En Argentina, esta especie ha sido citada en *S. oleraceus* (Nieto Nafría *et al.*, 1994).

Varias especies de áfidos pertenecientes al Género *Aphis* han sido identificadas desde *C. bursa pastoris* y *A. cristata*. El Género *Aphis* incluye más de 400 especies que ocurren principalmente en el Hemisferio Norte, sin embargo algunas de ellas son nativas de América del Sur, Nueva Zelanda y Australia. En Argentina 18 especies fueron registradas, incluyendo *A. gossypii* (Nieto Nafría *et al.*, 1994). *Aphis gossypii* es una especie polífaga que no ha sido registrada en trigo, pero en estaciones secas podría sobrevivir en pequeñas colonias en una importante variedad de plantas hospedadoras incluyendo Gramineae. *Aphis gossypii* es bien conocida por ser vector de virus fitopatógenos (Blackman y Eastop, 2000). En *M. sylvestris* fueron registrados los áfidos *Brachycaudus* sp., *M. persicae* y *A. malvae* pero únicamente *M. persicae* fue encontrado con infecciones fúngicas. Sin embargo *M. persicae* no podría ser considerado como un hospedador alternativo para uso en CBC, ya que ha sido registrado en una amplia variedad de especies de plantas cultivadas, tales como *C. annuum*, *Helianthus annuus*, *L. sativa*, *Brassica* sp., *Urtica urens* y *Malva* en Argentina (Nieto Nafría *et al.*, 1994).

#### Márgenes de cultivos como refugios para hongos entomofthorales.

Las infecciones causadas por hongos entomofthorales en áfidos desde la vegetación no cultivada fueron más frecuentemente observadas que en áfidos plaga del trigo.

De acuerdo con Powell *et al.* (1986), las infecciones causadas por hongos entomofthorales fueron más frecuentemente observadas en áfidos desde la vegetación

no cultivada que en áfidos de trigo. Los estudios de las asociaciones entre áfidos, sus plantas hospedadoras y hongos antagonistas constituyen un aspecto crítico en la implementación de CBC. Idealmente, éstas especies de plantas no deben ser hospedadores naturales de áfidos que podrían constituir un potencial peligro para el cultivo. En este estudio, de las especies de áfidos identificadas desde malezas asociadas a los bordes de cultivo de trigo, los hospedadores adecuados para hongos entomofthorales fueron: *A. nerii*, *B. brassicae*, *D. apiifolia*, *C. korschelti*, *H. carduellinus* y *U. sonchi*. Las especies de áfidos *Aphis gossypii* y *M. persicae* no podrían ser consideradas como hospedadores apropiados para uso en CBC ya que ambas especies han sido registradas desde una variedad de plantas hospedadoras cultivadas tales como *C. annuum*, *H. annuus* (girasol) *L. sativa*, *Brassica* sp., *U. urens* y *Malva* sp. en Argentina (Nieto Nafría *et al.*, 1994). Barta y Cagáñ (2003) han estudiado el potencial de parches de ortigas como reservorios naturales para patógenos en el agroecosistema y han identificado cinco especies patógenos *Microlophium carnosum*, incluyendo *P. neoaphidis* y *E. planchoniana*, que también fueron registrados en este estudio.

Shah *et al.* (2001) discutieron estrategias para la manipulación del habitat con énfasis en el rol de los márgenes de cultivos como refugios para hongos patógenos de áfidos especialmente *P. neoaphidis*. *Pandora neoaphidis* es el patógeno predominante en poblaciones naturales de áfidos (Feng *et al.*, 1990, 1992; Barta & Cagáñ, 2006; Scorsetti *et al.*, 2007, 2010; Toledo *et al.*, 2008; Hatting *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2010) y ha sido registrada en más de 70 especies de áfidos (Pell *et al.*, 2001). En Suiza, Keller & Suter (1980) citaron a *P. neoaphidis* y a *C. obscurus* en especies de áfidos en terrenos adyacentes a cultivos anuales. En este estudio, identificamos *P. neoaphidis* desde cinco especies de áfidos no plagas del trigo con una prevalencia de más de 70%. *Pandora neoaphidis* es el agente causal de epizootias más frecuente y más común (Nielsen *et al.*, 2003), causando hasta el 56.6% de mortalidad, lo que confirma la capacidad de este hongo como un agente efectivo de control biológico (Scorsetti *et al.*, 2010). Steenberg & Eilenberg (1995) registraron hasta el 60% de prevalencia de hongos entomofthorales en áfidos. En este estudio, *P. neoaphidis* fue observado causando epizootias en *H. carduellinus* desde *S. oleraceus*. Interesantemente, *H. carduellinus* fue la especie de áfido más abundante. Al parecer, epizootias de *P. neoaphidis* podrían ser favorecidas por la alta densidad del hospedador, el principal factor determinante de los

niveles de infección en algunos sistemas cultivo-áfido-patógeno (Wilding & Perry, 1980; Feng *et al.*, 1992).

*Zoophthora radicans* fue secundario a *P. neoaphidis* en ocurrencia y fue identificado en cinco especies de áfidos en plantas no cultivadas. La prevalencia de *Zoophthora radicans* alcanzó el 20% en *C. korschelti* y en *Aphis* sp. (Tabla 4.2). *Pandora neoaphidis* y *Z. radicans* fueron registrados causando infecciones en áfidos en trigo con prevalencias de hasta 90.2% (n = 278) y 83.9% (n = 205), respectivamente (Manfrino *et al.*, 2014a).

Cuando los cultivos importantes económicamente no están creciendo en el campo, la presencia de plantas no cultivadas contribuye a la presencia de los patógenos en el ambiente. Las siguientes asociaciones han sido identificadas para su posible inclusión en futuras estrategias de CBC de áfidos de cultivo de trigo en Argentina (planta/áfido/patógeno): *Sonchus oleraceus* (L.)/*Hyperomyzus carduellinus* (Theobald), *Uroleucon sonchi* (L.)/*Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber; *Sonchus oleraceus* (L.)/*Hyperomyzus carduellinus* (Theobald)/*Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko; *Lamium amplexicaule* (L.)/*Cryptomyzus korschelti* Bôrner/*P. neoaphidis*, *Z. radicans*, *Entomophthora planchoniana* Cornu; *Foeniculum vulgare* (Miller)/*Dysaphis apiifolia* (Theobald)/*Z. radicans*; *Morrenia brachystephana* Griseb/*Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe/*P. neoaphidis* and *Brassica rapa* L./ *Brevicoryne brassicae* (L.)/*P. neoaphidis*.

Los áfidos que son altamente probable para actuar como hospedadores alternativos para hongos incluyen: *H. carduellinus*, *U. sonchi*, *C. korschelti*, *B. brassicae*, *D. apiifolia* y *A. nerii*.

## CONCLUSIONES

- Se registraron importantes asociaciones entre plantas/áfidos alternativos/hongos entomophthorales que podrían ser incluidas en estrategias de Control Biológico Conservativo de áfidos plaga de cultivos de trigo en la zona oeste de la Región Pampeana.

- Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los hongos entomofthorales presentan un alto potencial en estrategias de CBC ya que han sido registradas importantes epizootias en áfidos de la vegetación espontánea.
- La vegetación asociada a los cultivos de trigo en las localidades estudiadas favorece la presencia de enemigos naturales en el agroecosistema.

## DISCUSIÓN GENERAL



## DISCUSIÓN GENERAL

Cada sistema de producción (extensivos vs intensivos) presenta características (con o sin riego, aplicaciones de agroquímicos, sistemas mecanizados) que los hacen menos o más compatibles con el control biológico mediante microorganismos.

Al comparar los sistemas productivos estudiados encontramos que, tanto en cultivos extensivos, como intensivos, como así también en la vegetación de crecimiento espontáneo presente en los bordes de los cultivos, fueron muy comunes y prevalentes las infecciones de hongos entomofthorales siendo comunes las especies de hongos identificadas. A pesar de haber sido identificadas las mismas especies en los diferentes sistemas, ha sido observado que en algunos vegetales fueron más comunes las infecciones de una especie que de otra. Por ejemplo, en la vegetación no cultivada presente en los bordes de los cultivos de trigo fueron muy comunes las infecciones de *P. neopahidis* en los distintos áfidos hospedadores. Mientras que en cultivos de crucíferas fueron más ocurrentes y más comunes las infecciones de *Z. radicans* que las de *P. neopahidis* en áfidos.

A partir del análisis de la ocurrencia y prevalencia de las infecciones fúngicas en áfidos; y del estudio de las relaciones entre los porcentajes de infección y los factores investigados en la presente tesis, surgen patrones de generalización que aportan a la profundización del conocimiento de las condiciones ecológicas necesarias para el desarrollo de los procesos de transmisión en los hongos entomofthorales en condiciones de campo.

Entre los principales aspectos que discutimos en este apartado, destacamos el efecto de factores tales como las características de las plantas hospedadoras, las aplicaciones de agroquímicos, el efecto de la temperatura y de la humedad relativa, la existencia de plantas “refugio” y la relación entre la densidad de la población hospedadora y la presencia de estadios susceptibles de hospedador.

En esta tesis encontramos que en algunos cultivos y plantas de crecimiento espontáneo fueron muy comunes las infecciones fúngicas, por ejemplo en *T. aestivum*, *A. sativa*, *S. melongena*, *C. annuum*, *B. oleracea* var. *capitata*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *B. oleracea* var. *italica*, *S. oleraceus* y *L. amplexicaule*, mientras que en otros fueron poco frecuentes como es el caso de *M. brachystephana* o *S. bicolor*; o directamente no

ocurrieron como es el caso de los cultivos de *S. lycopersicum* y *P. vulgaris*. De acuerdo a Steinkraus (2006) las características de la planta pueden influenciar en la transmisión de hongos patógenos de áfidos. Entre éstas, los químicos de las plantas es una de ellas. Duetting *et al.* (2003) mediante un estudio realizado en *Pisum sativum* han demostrado que la cera de las hojas de *P. sativum* podría afectar la infectividad y la supervivencia de los conidios de *P. neoaphidis* sobre la superficie de la planta. Estos autores encontraron mayores números de *Acyrtosiphum pisum* infectados cuando se redujeron los niveles de ceras. Los resultados obtenidos, nos permiten suponer que las plantas latescentes como *M. brachystephana* o con compuestos específicos, por ejemplo la  $\alpha$ -tomatina en el *S. lycopersicum*, podrían afectar la transmisión de hongos patógenos.

La mayoría de los estudios de interacciones a nivel tritrófico han comparado el impacto de las especies de plantas hospedadoras en el desarrollo de hongos patógenos en insectos herbívoros. Los estudios *in vitro* han demostrado que la adición de glucoalcaloides o una diversidad de extractos de plantas al medio puede inhibir el crecimiento de *B. bassiana* (Costa & Gaugler, 1989, Raghavaiah & Jayaramaiah, 1987) y de *N. rileyi* (Gallardo *et al.*, 1990). Chinchas adultas de *Blissus leucopterus* inoculadas con *B. bassiana* manifestaron una mayor mortalidad cuando se alimentaron de trigo, cebada o dieta artificial comparado con maíz o sorgo (Ramoska & Todd, 1985). Además, pocos cadáveres de las chinchas que habían comido maíz o sorgo produjeron conidios, lo que demuestra un adicional efecto inhibitorio de estos alimentos, presumiblemente como resultado de productos químicos vegetales secundarios fungistáticos. Cuando se añadió el glucoalcaloide  $\alpha$ -tomatina a la dieta artificial, el desarrollo de *N. rileyi* en *Helicoverpa zea* fue parcialmente inhibido a la concentración letal 50 e inhibido por completo a la concentración letal 90.

Por otro lado, la existencia de plantas “refugio” puede afectar la transmisión de hongos patógenos en el agroecosistema. En esta tesis destacamos la importancia de la presencia de especies vegetales de crecimiento espontáneo que podrían servir como refugios de especies áfidos alternativos como hospedadores de hongos entomofitales. Estas plantas podrían servir como fuentes de inóculo de hongos que en períodos desfavorables podría favorecer el desarrollo y la transmisión de infecciones fúngicas en el cultivo.

Al analizar los distintos factores que podrían influir en la aparición de infecciones fúngicas encontramos que aquellos cultivos sometidos a una fuerte presión de agroquímicos, como el caso del cultivo de *S. lycopersicum* entre los intensivos y los cultivos de *T. aestivum* y *S. bicolor* entre los extensivos, serían menos compatibles con el desarrollo de infecciones fúngicas que aquellos en los que las aplicaciones de activos de síntesis son ocasionales. En este estudio, en cultivo de *S. lycopersicum* no se encontraron infecciones fúngicas y fue registrado un importante número de pulgones muertos. En este cultivo, el manejo de las poblaciones de insectos se realiza mediante la utilización de activos de síntesis, las que llegan a hacerse hasta dos o tres veces por semana. Este hecho permitiría evidenciar que los insecticidas impidieron el desarrollo de infecciones fúngicas.

De acuerdo a Steinkraus (2006), los procesos de producción y descarga de esporas, dispersión, supervivencia y germinación dependen de las condiciones ambientales. De acuerdo a esto, el desarrollo de infecciones fúngicas se encontrará estrechamente relacionado a la estación en la que se producen los cultivos. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, podemos afirmar que la ocurrencia y la prevalencia de las infecciones de hongos entomofitofitos en áfidos estuvieron condicionadas por las condiciones de temperatura y de humedad relativa. En todos los sistemas estudiados (extensivos, intensivos y vegetación espontánea) fueron mayores los porcentajes de infección en la estación otoño-invierno. Cuando se comparó la dinámica de las entomofitofitosis en un mismo cultivo entre las dos estaciones, se registró mayor ocurrencia y porcentajes de infección más elevados en el cultivo de producción otoño-invierno que en el de estación primavera-verano lo que corroboraría que las condiciones de alta humedad y bajas temperaturas favorecen los procesos de producción, dispersión y germinación de esporas, posibilitando de esta manera la transmisión de los hongos patógenos y la consecuente ocurrencia de epizootias.

Densas poblaciones de áfidos con frecuencia favorecen la rápida diseminación del patógeno. La densidad de la población hospedadora ha sido considerada como el principal factor que determina los niveles de infección en algunos sistemas de cultivo-áfido-patógeno (Feng *et al.*, 1992; Rabasse and Robert, 1975; Robert *et al.*, 1973; Soper and MacLeod, 1981; Wilding and Perry, 1980). Al analizar la asociación entre la densidad de la población hospedadora y el porcentaje de infección fúngica para cada uno de los cultivos estudiados, encontramos que en la mayoría de los casos no hubo

asociación fuerte entre estas variables. En el caso de cultivos extensivos, en dos de los seis sitios estudiados (ambos pertenecientes a cultivos de trigo) se obtuvieron valores importantes en el coeficiente de regresión, mientras que en cultivos intensivos únicamente en cultivo de berenjena la variabilidad en el número de áfidos infectados puso ser explicada en función de la densidad de la población hospedadora.

Al investigar el efecto del estadio de desarrollo del hospedador en relación al número de áfidos infectados, fueron observadas diferencias entre los estados de desarrollo en la gran mayoría de cultivos, siendo el número de ninfas infectadas significativamente mayor que el número de adultos. Los resultados de la presente tesis demuestran que la mayoría de la población estuvo conformada por ninfas lo que supone que podría existir correlación entre las densidades de áfidos sanos e infectados. Que hayan sido ninfas la mayoría de la población infectada no quiere decir que estas sean más susceptibles a las infecciones, sino que está relacionado al modo de vida del hospedador. Los áfidos son hemimetábolos por lo que las ninfas viven y se alimentan en colonias con los adultos, resultando que toda la población es susceptible al ataque por patógenos fúngicos.



**CONCLUSIONES GENERALES Y  
PERSPECTIVAS FUTURAS**

## CONCLUSIONES GENERALES

- Se han registrado cuatro especies de hongos patógenos de áfidos en los sistemas de cultivos y especies de plantas de crecimiento espontáneo presentes en los bordes de los cultivos. *Pandora neoaphidis* se ha reconocido como la principal especie patógena de áfidos.
- Los elevados niveles de infección registrados en las poblaciones de pulgones y la ocurrencia de frecuentes epizootias determinan un alto potencial de los Hongos Entomophthorales como agentes de control biológico de áfidos, principalmente en sistemas intensivos.
- Las diferencias entre los estados de desarrollo de los áfidos resultaron significativas en la gran mayoría de los cultivos, siendo las ninfas la proporción de la población hospedadora más afectada por las micosis. Esto se explica en función de que, en cada cultivo, la mayor parte de la población estuvo conformada por ninfas.
- El desarrollo de las micosis en las poblaciones de áfidos apareció fuertemente influenciado por variables ambientales, como la temperatura y la humedad relativa, siendo más factible el control biológico por hongos entomophthorales en la estación otoño-invierno. Elevados porcentajes de humedad relativa y temperaturas relativamente bajas propiciaron la mayor ocurrencia y transmisión de hongos entomophthorales entre los meses de marzo-agosto. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de control microbiano mediante este grupo de hongos en cultivos de estación primavera-verano ya que se han registrado epizootias e importantes niveles de infección entre los meses de octubre-enero.
- Observamos que el desarrollo de las entomophthoromicosis en las poblaciones de áfidos no fue completamente inhibida por las aplicaciones de agroquímicos. Sin embargo futuros estudios de interacción entre agroquímicos y actividad fúngica son necesarios para determinar que compuestos serían compatibles con estrategias de control biológico mediante hongos entomophthorales.

- La dificultad para cultivar *in vitro* las especies de hongos Entomophthorales se presenta como el primer obstáculo para la producción en masa de estos hongos y por lo tanto para la elección de un método de aplicación de tipo inundativo. Sin embargo el grupo de hongos presenta un elevado potencial para estrategias de Control Biológico Conservativo. La profundización del conocimiento de las interacciones que ocurren en el agroecosistema son fundamentales para la implementación de estrategias de CBC con hongos. En este estudio, mediante el estudio de la composición de los bordes de los cultivos fue posible ampliar el entendimiento de factores que influyen en la transmisión de hongos entomophthorales como lo son las plantas de crecimiento espontáneo que, mediante sus áfidos hospedadores, sirven de refugio y fuente de inóculo.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

A fines de complementar y continuar el estudio de la línea de investigación abordada en esta tesis, se propone tener en cuenta los siguientes puntos:

- La profundización del estudio de la ecología de los patógenos es importante para favorecer el uso de estos agentes en contexto de Manejo Integrado de Plagas.
- La realización de ensayos *in vitro* de interacción de hongos Entomophthorales y los agroquímicos más utilizados en sistemas de cultivos es necesario para determinar qué compuestos son compatibles con la utilización de estos agentes de control biológico.
- Estudios de especificidad de Hongos Entomophthorales con enemigos naturales en condiciones controladas son necesarios para evaluar si las especies de hongos aquí registradas no infectan a otros organismos benéficos presentes en los agroecosistemas.
- El intento de producción en masa de la especie *Zoophthora radicans* constituiría un novedoso y aplicado aspecto en el estudio de los Hongos Entomophthorales.



**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS**

- Albrecht H. 2003. Suitability of arable weeds as indicator organisms to evaluate species conservation effects of management in agricultural ecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 98: 201-211.
- Altieri M.A. y Whitcomb W.H. 1979. Agroecología y manejo de plagas. pp. 29-39. EN: Altieri, M. A. 1992. Biodiversidad, Agroecología y Manejo de Plagas. Cetal, USA. 162 pp.
- Altieri M.A. y Whitcomb W.H. 1980. Agroecología y manejo de plagas. pp. 29-39. EN: Altieri, M. A. 1992. Biodiversidad, Agroecología y Manejo de Plagas. Cetal, USA. 162 pp.
- Altieri M.A., Schoonhoven A.V. y Doll J.D. 1977. Agroecología y manejo de plagas. pp. 29-39. EN: Altieri, M. A. 1992. Biodiversidad, Agroecología y Manejo de Plagas. Cetal, USA. 162 pp.
- Alzugaray R., Ribeiro A., Silva H., Stewart S., Castiglioni E., Bartaburu S., Martínez J. 2010. Prospección de agentes de mortalidad natural de áfidos en leguminosas forrajeras en Uruguay. *Agrociencias*, 1: 27–35.
- Alzugaray R., Zerbino M.S., Stewart S., Ribeiro A., Eilenberg J. 1998. Epizootiología de hongos Entomophthorales. Uso de *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko (Zygomycotina: Entomophthorales) para el control de *Epinotia aporema* (Wals.) (Lepidoptera: Tortricidae) en Uruguay. *Rev. Soc. Entomol. Arg.*, 58: 307–311.
- Anderson R.M., May R.M. 1981. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 291, 451-524.
- Aragón 1997. Plagas del trigo y su control. En: Trigo. Actualización técnica 1996/1997. INTA, E.E.A. Marcos Juárez y SAPyA. Pág. 41 - 45.
- Asteraki E.J., Hart B.J., Ings T.C., Manley W.J. 2004. Factors influencing the plants and invertebrate diversity of arable field margins. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 102: 219-231.

- Bałazy S. 1993. Flora of Poland. Fungi (Mycota), vol. 24: Entomophthorales. Polish Acad. Science, W. Szafer Inst. Botany, 356 pp.
- Barbosa P. 1998. Conservation Biological Control. Academic Press, San Diego.
- Barta M. & Cagáň L. 2003a. Entomophthoralean fungi associated with common nettle aphid (*Microlophium carnosum* Buckton) and the potential role of nettle patches as reservoirs for the pathogens in landscape. J. Pest Sci. 76: 6–13.
- Barta M. & Cagáň L. 2003b. *Pandora uroleuconii* sp. nov. (Zygomycetes: Entomophthoraceae), a new pathogen of aphids. Mycotaxon, 88: 79–86.
- Barta M. & Cagáň L. 2006. Observations on the occurrence of Entomophthorales infecting aphids (Aphidoidea) in Slovakia. BioControl, 51: 795–808.
- Beirne B.P. 1970. Effects of precipitation on crop insects. Can. Entomol., 102: 1360–1373.
- Bellini R., Mullens B.A. & Jespersen J.B. 1992. Infectivity of two members of the *Entomophthora muscae* complex (Zygomycetes: Entomophthorales) for *Musca domestica* (Dipt.: Muscidae). Entomophaga, 37: 11-19.
- Bertolaccini I, Sánchez D. y Arregui C. 2010. Incidencia de algunos factores naturales de mortalidad de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), en el área centro-este de Santa Fe, Argentina. Horticultura Argentina, 29: 20-24.
- Bertolaccini I., Imwinkelried J., López J. y Salto C. 1993. Observaciones preliminares de las interacciones malezas-fitófagos-enemigos naturales en el área central de la provincia de Santa Fe. Gaceta Agronómica, Vol. XII, N° 71.
- Bidochka M., Walsh S.R.A., Ramos M.E., St. Leger, R.J., Silver J.C., Roberts D.W. 1995. Pathotypes in the *Entomophaga grylli* species complex of grasshopper pathogens differentiated with random amplification of polymorphic DNA and cloned-DNA probes. Appl. Environ. Microbiol., 61: 556-560.
- Bidochka M.J., St. Leger R.J., Stuart S. y Gowanlock K. 1999. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and

- plant virulence, extracellular protease and carbohydrases. *Microbiology*, 145: 955-963.
- Blackman R.L. and Eastop V.F. 2000. *Aphids on the World's Crops. An Identification and Information Guide*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- Blackman R.L. and Eastop V.F. 2006. *Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs. Vol 1. Host Lists and Keys*. John Wiley & Sons, Chichester, England. 1024 pp.
- Blackman R.L. and Eastop V.F. 2006. *Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs. Vol 2. The Aphids*. John Wiley & Sons, Chichester, England. 1439 pp.
- Botto E. 1999. Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. *Rev. Soc. Entomol. Arg.*, 58, 58-64.
- Botto E.N. and Hernández M.C. 1989. Contribución al conocimiento de los enemigos naturales de los áfidos plaga de los cereales en la República Argentina. Claves para la identificación de los áfidos momificados y los parasitoides primarios. *Rev. Soc. Entomol. Argent.*, 46: 75-85.
- Bowman B.H., Taylor J.W., Brownlee A.G., Lee J., Lu S.D. y White T.J. 1992. Molecular evolution of the fungi: relationships of the Basidiomycetes, Ascomycetes and Chytridiomycetes. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 285-296.
- Brobyn P.J., Wilding N., Clark S.J. 1985. The persistence of infectivity of conidia of the aphid pathogen *Erynia neoaphidis* on leaves in the field. *Ann. Appl. Biol.*, 107: 365-376.
- Bruns T.D., White, T.J., Taylor J.W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 22: 525-564.
- Butt T.M., Jackson C., Magan N., 2001. Fungal biocontrol agents-appraisal and recommendations, in: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI Wallingford, pp. 27-69.

- Carruthers RI, Soper RS. 1987. Epizootiology of insect diseases. Wiley, New York. Fungal diseases; p. 357-416.
- Carver M. 1991. Superfamilia Aphidoidea. In: Carver, M.; Gross, G.F. & Woodward, T.E. Hemiptera. In: CSIRO Division of Entomology: The insect of Australia. A textbook for students and research workers. Vol 1 (second edition): 452-457. Melbourne University Press. Melbourne (Australia). In: Nieto Nafría, J.; Delfino, M.A. y Mier Durante, M.P. 1994. La afidofauna de la Argentina, su conocimiento en 1992. Universidad de León, España, p. 26.
- CASAFE. 2007. Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. Cámara de sanidad agropecuaria y fertilizantes de la República Argentina, Buenos Aires, Argentina.
- Costa SD, Gaugler R. 1989. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to solanine and tomatine: plant defensive chemicals inhibit an insect pathogen. J. Chem. Ecol., 15:697-706
- Dean G.J.W. & Wilding, N. 1973. Infection of cereal aphids by the fungus *Entomophthora*. Ann. Appl. Biol., 74: 133-138.
- Dedryver C.A. 1983. Field pathogenesis of three species of Entomophthorales of cereal aphids in Western France, pp. 11-19. In: R. Cavalloro [ed.], Aphid Antagonists. A. A. Balkema Publishers, Rotterdam, The Netherlands.
- Delalibera I., Hajek A.E., Humber R.A. 2004. *Neozygites tanajoae* sp. nov., a pathogen of the cassava green mite. Mycologia. 96: 1002-1009.
- Delalibera Jr. I., de Moraes G.J., Lapointe S.L., da Silva C.A.D., Tamai M.A. 2000. Temporal variability and progression of *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in populations of *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae). An. Soc. Entomol. Brasil. 29: 523-535.
- Delfino M.A. 2004. Aphididae. En: Cordo, H.A.; G. Logarzo; K. Braun & O. Di Iorio (Directores). Catálogo de insectos fitófagos de la Argentina y sus plantas asociadas, pág. 287-328. Sociedad Entomológica Argentina ediciones. Buenos Aires, Argentina.

- Delfino M.A. 2005. Inventario de las asociaciones áfido-planta en el Perú. *Ecol. Apl.* 4: 143-158.
- Delfino M.A., Binazzi A. 2002. Áfidos de Coníferas en la Argentina (Hemiptera: Aphididae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.*, 61: 27-36.
- Díaz B., Legarrea S., Marcos-García M.A., Fereres A. 2010. The spatio-temporal relationships among aphids, the entomophthoran fungus, *Pandora neoaphidis*, and aphidophagous hoverflies in outdoor lettuce. *Biol. Control.* 53: 304–311.
- Díaz B.M., López Lastra C.C., Oggerin M., Fereres A., Rubio V. 2008. Identificación de hongos entomopatógenos asociados a pulgones en cultivos hostícolas en la zona centro de la Península Ibérica. *Bol. San. Veg. Plagas.* 34: 287-296.
- Diez S.L. & J.C. Gamundi. 1985. Empleo de enfermedades como método de biocontrol de insectos plagas. *Tecnología para el campo.* INTA. 10: 19-20.
- Dragún P., Moreno A.M., Picasso S., Lardizabal J., Gatti N., Tellechea M., Conti A. 2010. Monitoreo y estudio de cadenas de valor ONCCA. Informe de sorgo. Buenos Aires (AR): ONCCA, 18 p. Disponible en: [http://www.oncca.gov.ar/documentos/2\\_cadena\\_sorgo\\_101227.pdf](http://www.oncca.gov.ar/documentos/2_cadena_sorgo_101227.pdf)
- Driver F., Milner R.J. y Trueman J.W.H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 104: 143-150.
- Duetting P.S., Ding H., Neufeld J., Eigenbrode S.D. 2003. Plant waxy bloom on peas affects infection of pea aphids by *Pandora neoaphidis*. *J. Invertebr. Pathol.* 84: 149–158.
- Edelstein J.D. & Lecuona R.E. 2003. Presencia del hongo entomopatógeno *Pandora gammae* (Weiser) Humber (Zygomycetes: Entomophthorales) en el complejo de orugas medidoras de la soja (Lepidoptera: Plusiinae) en Argentina. *Rev. Invest. Agron. RIA.* INTA, 32: 31- 38.
- Eilenberg J. 1988. Occurrence of fungi from Entomophthorales in a population of carrot flies (*Psila rosae* F.) Results 1985 and 1986. *IOBC Bull.* 11: 53-59.

- Eilenberg J., Hajek A.E., Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*. 46: 387-400.
- Ekesi S., Shah P.A., Clark S.J., Pell J.K. 2005. Conservation biological control with the fungal pathogen *Pandora neoaphidis*; implications of aphid species, host plant and predator foraging. *Agric. Forest. Entomol.* 7: 21-30.
- Enkerli J., Fournier A., Keller S., Widmer F. 2005b. Cultivation independent tools for detection, identification, and monitoring of entomopathogenic fungi in the soil. Annual Scientific Meeting of the British Mycological Society Manchester, UK. September 5-8.
- Feng M.G., Chen C., Chen B. 2004. Wide dispersal of aphid-pathogenic Entomophthorales among aphids relies upon migratory alates. *Environ. Microbiol.* 6: 510–516.
- Feng M.G., Johnson J.B., Kish L.P. 1990. Survey of entomopathogenic fungi naturally infecting cereal aphids (Homoptera: Aphididae) of irrigated grain crops in southwestern Idaho. *Environ. Entomol.* 19: 1534-1542.
- Feng M.G., Nowierski R.M., Johnson J.B., Poprawski T.J. 1992. Epizootics caused by entomophthoralean fungi (Zygomycetes, Entomophthorales) in populations of cereal aphids (Homoptera, Aphididae) in irrigated small grains of southwestern Idaho, USA. *J. Appl Entomol.* 113: 376–390.
- Feng M.G., Nowierski R.M., Scharen A.L. & Sands D.C. 1991. Entomopathogenic fungi (Zygomycotina, Entomophthorales) infecting cereal aphids (Homoptera: Aphididae) in Montana. *Pan-Pac. Entomol.* 67: 55-64.
- Foster S.P., Denholm I., Devonshire A.L. 2000. The ups and downs of insecticide resistance in peach–potato aphids (*Myzus persicae*) in the UK. *Crop. Prot.* 19: 873-879.
- Francis C., Anagnou-Veroniki M., Rouffaud M.A., de Bièvre C., Papierok B. 2004. Morphometric and genetic variation among strains of two related species of *Erynia* (Zygomycota, Entomophthorales) isolated from aphids or Diptera in a limited geographical area in Greece. *J. Mycol Méd.* 14: 171-180.

- Fresa R. 1971. El hongo *Entomophthora grylli* en tucuras. Rev. Soc. Ent. Arg. 8: 83-88.
- Fresa R. 1979. Hongos entomopatógenos observados en larvas de lepidopteros perjudicales para cultivos de la República Argentina. I.D.I.A 373: 149-155.
- Fuxa J.R. & Tanada Y. 1987. Epidemiological concepts applied to insect epizootiology, in: Epizootiology of Insect Diseases, John Wiley, New York, pp. 3-21.
- Gallardo F., Boethel O.J., Fuxa J.R., Richter A. 1990. Susceptibility of *Heliothis zea* (Boddie) larvae to *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson: effects of a-tomatine at the third trophic level. J. Chem. Ecol. 16: 175 1-59.
- Glare T.R., Milner R.J., Chilvers G.A. 1986. The effect of environmental factors on the production, discharge, and germination of primary conidia of *Zoophthora phalloides* Batko. J. Invertebr. Pathol. 48: 275-283.
- Gurr G.M., Wratten S.D., Altieri M.A. 2004. Ecological engineering for pest management: advances in habitat manipulation for arthropods. CSIRO Publishing, Australia.
- Hajek A.E. & St. Leger R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Ann. Rev. Entomol. 39: 293-322.
- Hajek A.E., Hodge K.T., Liebherr J.K., Day W.H. Vandenberg J.D. 1996. Use of RAPD analysis to trace the origin of the weevil pathogen *Zoophthora phytonomi* in North America. Mycol. Res. 100: 349-355.
- Hajek A.E., Jensen A.B., Thomsen L., Hodge K.T., Eilenberg J. 2003. PCR-RFLP is used to investigate relations among species in the entmopathogenic genera *Eryniopsis* and *Entomophaga*. Mycologia. 95: 262-268.
- Hall A.J., Rebella C.M., Ghersa C.M., Cullot J.P. 1992. Ecosystems of the world: Field crops ecosystems, Elsevier Scientific: New York. Field crop systems of the Pampas.
- Hall A.J., Rebella C.M., Ghersa C.M., Cullot J.P. 1992. Ecosystems of the world: Field crops ecosystems, Elsevier Scientific: New York. Field crop systems of the Pampas.

- Harper J.D. 1987. Applied epizootiology: microbial control of insects. In: Fuxa, J. R., Tanada, Y. (Eds.), *Epizootiology of Insect Diseases*. Wiley, New York, pp. 473–496.
- Hatting J.L., Humber R.A., Poprawski T.J., Miller R.M. 1999. A survey of fungal pathogens of aphids from South Africa, with special reference to cereal aphids. *Biol. Control*. 16: 1-12.
- Hatting J.L., Poprawski T.J., Miller R.M. 2000. Prevalences of fungal pathogens and other natural enemies of cereal aphids (Homoptera: Aphididae) in wheat under dryland and irrigated conditions in South Africa. *BioControl*. 45: 179–199.
- Hibbett D.S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans. Mycol. Soc. Jap.* 33: 533-556.
- Hodge K.T., Sawyer A.J., Humber R.A. 1995. RAPD-PCR for identification of *Zoophthora radicans* isolates in biological control of the potato leafhopper. *J. Invertebr. Pathol.* 65: 1-9.
- Humber R.A. 1991. Fungal pathogens of aphids. In *Aphid–Plant Interactions: populations to Molecules*. Eds D.C. Peters, J.A. Webster and C.S. Chlouser. Stillwater, OK, USA: Oklahoma State University.
- Humber R.A. 1997. Fungi: Identification. In: Lacey LA, editor. *Manual of techniques in insect pathology*. London: Academic Press; p. 153–185.
- Humber R.A. 2012a. *Entomophthoromycota*: a new phylum and reclassification of entomophthoroid fungi. *Mycotaxon*. 120: 477-492.
- Humber R.A. 2012b. Identification of entomopathogenic fungi. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. 2 edn, pp. 151–187. Ed L.A. Lacey. Amsterdam, The Netherlands: Academic Press.
- Imwinkelried J.M., Fava F.D. y Trumper E.V. 2004. Pulgones que atacan al cultivo de trigo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Centro Regional Córdoba. EEA Manfredi, Boletín N° 8, 6 p.

- INFOSTAT. 2004. *InfoStat versión 2004*, pp. 314. Argentina: Grupo InfoStat, Facultad Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba Primera edición. Editorial Brujas.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M. Strasser H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests, in: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing,
- Inglis P.W. y Tigano M.S. 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. *Genet. Mol. Biol.* 29: 132-136.
- Jensen A.B., Eilenberg J. 2001. Genetic variation within the insect-pathogenic genus *Entomophthora*, focusing on the *E. Muscae* complex, using PCR-RFLP of the ITS II and the LSU rDNA. *Mycol. Res.* 105: 307-312.
- Jensen A.B., Gargas A., Eilenberg J., Rosendahl S. 1998. Relationships of the insect-pathogenic order entomophthorales (Zygomycota, fungi) based on phylogenetic analyses of nuclear small subunit ribosomal DNA sequences (SSU rDNA). *Fungal Genet. Biol.* 24: 325-334.
- Jensen A.B., Thomsen L., Eilenberg J. 2001. Intraspecific variation and host specificity of *Entomophthora muscae* sensu stricto isolates revealed by random amplified polymorphic DNA, universal primed PCR, PCR-restriction fragment length polymorphism, and conidial morphology. *J. Invertebr. Pathol.* 78: 251-259.
- Karner M.A., Goodson J.R. and Payton M., 1997. Efficacy of various insecticide treatments to control cotton aphids and prevent economic loss in Oklahoma in 1995. *Proc. Beltwide Cotton Conf.*, pp. 1054-1057.
- Keller S, Suter H. 1980. Epizootiologische Untersuchungen über das *Entomophthora*-Auftreten bei feldbaulich wichtigen Blattlausarten. *Oecologia Applicata.* 1: 63-81.
- Keller S. & Petrini, O. 2005. Keys to the identification of the arthropod-pathogenic genera of the families Entomophthoraceae and Neozygitaceae (Zygomycetes), with description of three new subfamilies and new genus. *Sydowia*, 57: 23-53.

- Keller S. 1991. Arthropod-pathogenic Entomophthorales of Switzerland II. *Erynia*, *Eryniopsis*, *Neozygites*, *Zoophthora*, and *Tarichium*. *Sydowia*, 43:39-122
- Keller S. 2006. Species of Entomophthorales attacking aphids with description of two new species. *Sydowia*, 58: 38–74.
- Keller S. 1987. Arthropod-pathogenic Entomophthorales of Switzerland. I. *Conidiobolus*, *Entomophaga* and *Entomophthora*. *Sydowia*, 40: 122-167.
- Keller S. 1997. The genus *Neozygites* (Zygomycetes: Entomophthorales) with special reference to species found in tropical regions. *Sydowia*, 49: 118–146.
- Kim J.J. and Roberts D.W. 2012. The relationship between conidial dose, moulting and insect developmental stage on the susceptibility of cotton aphid, *Aphis gossypii*, to conidia of *Lecanicillium 281 attenuatum*, an entomopathogenic fungus. *Biocontrol. Sci. Techn.*, 22: 319-331.
- Kish L.P. and Allen G.E. 1978. The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatilis* in soybean. *Univ. of Fla. Agric. Exp. Stat. Tech. Bull.* 795.
- Kogan M. 1998. Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 243-270.
- Landis D.A., Wratten S.D., Gurr G.M.. 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Ann. Rev. Entomol.*, 45: 175-201.
- Lanfranco L., Perotto S., Bonfante P. 1998. Applications of PCR for studying the biodiversity of mycorrhizal fungi. In: *Application of PCR in Mycology* (eds. Bridge, P.D.; Arora, D.K.; Reddy, C.A.; Elander, R.P.), CAB International, Wallingford, UK: 107-124.
- Lange C.A. 1996. *Melonoplus* (Orthoptera: Acrididae) afectadas por micosis en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Soc. Ent. Arg.*, 55: 107-109.
- Lázzari S.N. 1985. Natural enemies of aphids (Homoptera: Aphididae) on barley (*Hordeum* sp.) in Parana. *An. Soc. Entomol. Bras.*, 14: 5–15.

- Lecuona R.E. 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Ed. Buenos Aires, Argentina: Talleres gráficos Mariano Mas.
- Lecuona R.E. y Frutos E. 1983. Influencia de algunos factores climáticos sobre la población del pulgón amarillo de los cereales *Metopolophium dirhodum* Walk. INTA. E.E.R.A. Pergamino. Informe técnico N° 182. 19 Págs.
- Limongelli J.C. 1979. El repollo y otras crucíferas de importancia en la huerta comercial. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. 144 pp.
- López Lastra C.C. y Scorsetti A.C. 2007. Revisión de los hongos entomofthorales (Zygomycota: Zygomycetes) patógenos de insectos de la República Argentina. Bol. Soc. Bot. Arg., 42: 33-37.
- López Lastra C.C., Mazzucchelli M.G. and Dikgolz V. 2003. Temporal changes in the prevalence of three species of Trichomycetes (Zygomycota: Zygomycotina) in Dipteran aquatic larvae from Argentina. Fungal Divers., 14: 87-95.
- López Lastra C.C., Siri A., García J.J., Eilenberg J. & Humber R.A. 2006. *Entomophthora ferdinandii* (Zygomycetes: Entomophthorales) causing natural infections of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Argentina. Mycopathologia, 161: 251-254.
- López Lastra C.C., Siri A., García J.J., Eilenberg J., Humber R.A. 2006. *Entomophthora ferdinandii* (Zygomycetes: Entomophthorales) causing natural infections of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Argentina. Mycopathologia, 161: 251–254.
- López Lastra C.C. & Scorsetti A.C. 2006. Hongos Entomofthorales patógenos de insectos de la República Argentina. Rev. Biol. Trop., 54: 311-315.
- MacLeod D.M. 1955. A fungous enemy of the pea aphid, *Macrosiphum pisi* (Kaltenbach). Can. Entomol., 87: 503–505.
- MacLeod D.M., Müller-Kögler E., Wilding N. 1976. *Entomophthora* species with *E. muscae*-like conidia. Mycologia, 68: 1–29.

- Manfrino R., Salto C.E. & Zumoffen L. 2011. Estudio de las asociaciones áfidos-entomófagos sobre *Foeniculum vulgare* (Umbelliferae) y *Conyza bonariensis* (Asteraceae) en la región central de Santa Fe, Argentina. Rev. Soc. Entomol. Arg., 70: 99-109.
- Manfrino R.G., Hatting J.L., Humber R., Salto C.E. & López Lastra C.C. 2014a. Natural occurrence of entomophthoroid fungi (Entomophthoromycota) of aphids (Hemiptera: Aphididae) on cereal crops in Argentina. Ann. Appl. Biol., 164: 151-158.
- Manfrino R.G., Zumoffen L., Salto C.E. & López Lastra C.C. 2014b. Natural occurrence of entomophthoroid fungi of aphids pests on *Medicago sativa* L. in Argentina. Rev. Argent. Microbiol., 46: 49-52.
- Manfrino R.G., Zumoffen L., Salto C.E. & López Lastra C.C. 2013. Potential plant-aphid-fungal associations aiding conservation biological control of cereal aphids in Argentina. Int. J. Pest Manage., 59: 314-318.
- Manfrino R.G., Gutiérrez A.C., Steinkraus D., Salto C.E y López Lastra C.C. 2014c. Prevalence of entomophthoralean fungi (Entomophthoromycota) of aphids (Hemiptera: Aphididae) on solanaceous crops in Argentina. J. Invertebr. Pathol., 121: 21-23. DOI: 10.1016/j.jip.2014.06.003.
- Marchionatto J.B. 1934. Algunos hongos entomopatógenos comunes en la República Argentina y las posibilidades de su aplicación agrícola. Rev. Fac. Agr. y Vet., 7: 571-584.
- Marzocca A. 1976. Manual de Malezas. Ed. Hemisferio Sur. Pasteur 743. Buenos Aires. Argentina.
- McLeod P.J., Steinkraus D.C., Correll J.C., Morelock T.E. 1998 Prevalence of *Erynia neoaphidis* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) infections of green peach aphid (Homoptera: Aphididae) on spinach in the Arkansas River Valley. Environ. Entomol., 27: 796–800.

- Mietkiewski R.T., Pell J.K., Clark S.J. 1997. Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK: field and laboratory comparisons. *Biocontrol. Sci. Techn.*, 7: 565-575.
- Moore G.D., Gao X., Denholm I., Devonshire A.L. 1996. Characterisation of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Phys.*, 56: 102–110.
- Mullis F., Falcoma F., Scharf S., Snikl R., Horm G. y Erlich H. 1986. PCR a practical approach. Oxford University Press, Oxford.
- Nagahama T., Sato H., Shimazu M., Sugiyama J. 1995. Phylogenetic divergence of the entomophthoralean fungi: Evidence from nuclear 18S ribosomal RNA gene sequences. *Mycologia*, 87: 203-209.
- Nault L.R. 1997. Arthropod Transmission of Plant Viruses: A New Synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 90: 521-541.
- Nielsen C., Eilenberg J., Dromph K.M. 2001. Entomophthorales on cereal aphids: characterisation, growth, virulence, epizootiology and potential for microbial control. Copenhagen: Ministry of Environment.
- Nielsen C., Hajek A.E., Humber R.A., Bresciani J., Eilenberg, J. 2003. Soil as an environment for winter survival of aphid-pathogenic Entomophthorales. *Biol. Control*, 28: 92–100.
- Nielsen C., Milgroom M.G., Hajek A. 2005. Genetic diversity in the gipsy moth fungal pathogen *Entomophaga maimaga* from founder populations in North America and source populations in Asia. *Mycol. Res.*, 109: 941-950.
- Nielsen C., Sommer C., Eilenberg J., Hansen K.S., Humber R.A. 2001. Characterization of aphid pathogenic species in the genus *Pandora* by PCR techniques and digital images analysis. *Mycologia*, 93: 864-874.
- Nieto Nafría J., Delfino M.A., Mier Durante M.P. 1994. La afidofauna de la Argentina, su conocimiento en 1992. Universidad de León, España, 235 p.

- Panigatti J. 1980. Consideraciones sobre el clima del centro oeste de la provincia de Santa Fe. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Boletín Interno Divulgación, 15, 26.
- Panigatti J., Hein N., Mosconi F. 1982. Mapa detallado de suelos de la Estación Experimental Regional Agropecuaria Rafaela. INTA EEA Rafaela. Publicación Miscelánea 13. p/s/n.
- Papierok B. y Hajek A.E. 1997. Fungi: Entomophthorales. En: Lacey L, (Ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. San Diego, California: Academic Press. pp. 187-211.
- Pell J.K. 2007. Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management, Research Signpost, Kerala, India. Ecological approaches to pest management using entomopathogenic fungi: concepts, theory, practice and opportunities; p. 145-177.
- Pell J.K., Eilenberg J., Hajek A.E., Steinkraus, D.S. 2001. Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. In *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, 71–154. T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan. Wallingford, Oxon, UK: CAB International. 390.
- Pell J.K., Hannam J.J., Steinkraus D.C. 2010. Conservation Biological Control using fungal entomopathogens. *BioControl*, 55: 187-198.
- Pérez Moreno I. 2000. Fundamentos teóricos del manejo integrado de plagas. *Rev. Entomol. Apl.*, 27: 127-133.
- Pickering J., Gutiérrez A.P. 1991. Differential impact of the pathogen *Pandora neoaphidis* (R&H.) Humber (Zygomycetes: Entomophthorales) on the species composition of *Acyrtosiphon* aphids in alfalfa. *Can Entomol.*, 123: 315-320.
- Powell W., Walters K., A'Hara S., Ashby J., Stevenson H., Northing P. 2003. Landscape management for functional biodiversity; IOBC/WPRS Bull. 26/4. Using field margin diversification in agri-environment schemes to enhance aphid natural enemies; p. 123-128.

- Powell W., Wilding N., Brobyn P.J., Clark S.J. 1986. Interference between parasitoids (Hym, Aphidiidae) and fungi (Entomophthorales) attacking cereal aphids. *Entomophaga*, 31: 193-199.
- Rabasse J.M., Robert Y. 1975. Facteurs de limitation des populations d'*Aphis fabae* Scop. Dans l'ouest de la France. II – Incidence des mycosis à *Entomophthora* sur les populations des hôtes primaires et de la féverole de printemps. *Entomophaga*, 20: 49-63.
- Raghavaiah G., Jayaramaiah M. 1987. Antifungal activity of selected plant extracts against the white muscardine fungus. *Curro Res.*, 17: 62-64
- Ramoska W.A., Todd T. 1985. Variation in efficacy and viability of *Beauveria bassiana* in the chinch bug (Hemiptera: Lygaeidae) as a result of feeding activity on selected host plants. *Environ. Entomol.*, 14: 146-48
- Robert Y., Rabasse J.M., Scheltes P. 1973. Facteurs de limitation des populations d'*Aphis fabae* Scop. Dans l'ouest de la France. *Entomophaga*, 18: 61-75.
- Rohel E., Couteaudier Y., Papierok B., Cavelier N., Dedryver C.A. 1997. Ribosomal internal transcribed spacer size variation correlated with RAPD-PCR pattern polymorphisms in the entomopathogenic fungus *Erynia neoaphidis* and some closely related species. *Mycol. Res.*, 101: 573-579.
- Romero F. 2004. Manejo Integrado de Plagas: las bases, los conceptos y su mercantilización. Chapingo, Tezcoco, México. 109 pp.
- Ruano-Rossil J.M., Radcliffe E.B. and Ragsdale D.W. 2002. Disruption of entomopathogenic fungi of green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), by fungicides used to control potato late blight, in: Simon, J.C., Dedryver C. A., Rispe, C., Hullé, M. (Eds.), *Aphids in a New Millennium* Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, pp. 365-370.
- Saini E.D. 2005. Insectos perjudiciales a los cereales de invierno y sus enemigos naturales. INTA. IMYZA, Publicación N° 10, 60 p.

- Salto C. 2008. Comparan económicamente alternativas de control de la polilla del repollo. ASAPROVE Informa. Buenos Aires, Argentina. Año VII, núm. 29. [.http://www.corrientesaldia.com.ar/noticia.aspx?id=104978](http://www.corrientesaldia.com.ar/noticia.aspx?id=104978)
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74: 5463-5467.
- Sarandón S. 2003. Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable. E.C.A. Ediciones Científicas Americanas: 557p.
- Satorre E. 2004. Marco conceptual de la sustentabilidad: El suelo y la aplicación de pronósticos climáticos en la región pampeana. *Actas Seminario Sustentabilidad de la Producción Agrícola*, 29-30 de marzo de 2004, Buenos Aires: 9-13.
- Scorsetti A.C., Humber R., García J.J. & López Lastra C.C. 2007. Natural occurrence of entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) of aphid (Hemiptera: Aphididae) pests of horticultural crops in Argentina. *Biocontrol*, 52: 641-655.
- Scorsetti A.C., Jensen A.B., López Lastra C.C., Humber R.A. 2012. First report of *Pandora neoaphidis* resting spore formation *in vivo* in aphid hosts. *Fungal Biol.*, 116: 196–203.
- Scorsetti A.C., López Lastra C.C. 2007. Primer registro del hongo *Neozygites* sp. (Zygomycota: Entomophthorales) patógeno de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) en la República Argentina. *Bol. Soc. Arg. Bot.*, 42: 189–193.
- Scorsetti A.C., Maciá A., Steinkraus D.C., López Lastra C.C. 2010 Prevalence of *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales) infecting *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae) on lettuce crops in Argentina. *Biol. Control.*, 52: 46–50
- Shah P.A. & Pell J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61: 413-423.
- Shah P.A. & Pell J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 61: 413-423.

- Shufran R.A., Wilde G.E., Sloderbeck P.E., Morrison W.P. 1997 Occurrence of insecticide resistant greenbugs (Homoptera: Aphididae) in Kansas, Texas, Oklahoma, and Colorado and suggestions for management. *J. Econ Entomol.*, 90: 1106–1116.
- Siegel S. 1956. *Non-Parametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New York, NY, USA: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- Sierotzki H., Camastral F., Shah P.A., Aebi M., Tuor U. 2000. Biological characteristics of selected *Erynia neoaphidis* isolates. *Mycol. Res.*, 104: 213-219.
- Smith M.T., Hardee D.D. 1993. Influence of fungicides applied at planting on seasonal development of the fungus, *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Batko in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, in: *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference*, Nat. Cotton Council America, Memphis, TN, pp. 744-746.
- Soper R.S., McLeod D.M. 1981. Descriptive epizootiology of aphid mycosis. U. S. Dept. Agr. Tech. Bul. 1632.
- Spedding C.R. 1995. Sustainability in animal production systems. *Anim. Sci.*, 61: 1-8
- Steenberg T. y Eilenberg J. 1995. Natural occurrence of entomopathogenic fungi on aphids at an agricultural field site. *Czech Mycology* 48 pp.
- Steinkraus D.C. 2006. Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. *J. Invertebr Pathol.*, 92: 125-131.
- Steinkraus D.C. 2006. Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. *J. Invertebr. Pathol.*, 92: 125-131.
- Steinkraus D.C., Boys G.O. 2005. Mass harvesting of the entomopathogenic fungus, *Neozygites fresenii*, from natural field epizootics in the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 88: 212–217.
- Steinkraus D.C., Boys G.O. 2005. Mass harvesting of the entomopathogenic fungus, *Neozygites fresenii*, from natural field epizootics in the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 88: 212–217.

- Steinkraus D.C., Boys G.O., Rosenheim J.A. 2002. Classical biological control of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) with *Neozygites fresenii* (Entomophthorales: Neozygitaceae) in California cotton. *Biol. Control.*, 25: 297–304.
- Steinkraus D.C., Hollingsworth R.G., Slaymaker P.H. 1995. Prevalence of *Neozygites fresenii* (Entomophthorales: Neozygitaceae) on cotton aphids (Homoptera: Aphididae) in Arkansas cotton. *Environ. Entomol.*, 24: 465–474.
- Steinkraus D.C., Slaymaker P.H. 1994. Effect of temperature and humidity on formation, germination, and infectivity of conidia of *Neozygites fresenii* (Zygomycetes: Neozygitaceae) from *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *J. Invertebr. Pathol.*, 64:130-137.
- Takamatsu S. 1998. PCR applications in fungal phylogeny. In: *Application of PCR in Mycology* (eds. Bridge, P.D.; Arora, D.K.; Reddy, C.A.; Elander, R.P.), CAB International, Wallingford, UK: 125-152.
- Thomsen L., Jensen A.B. 2002. Application of nested-PCR technique to resting spores from the *Entomophthora muscae* species complex: implications for analyses of host-pathogen population interactions. *Mycologia*, 94: 794-802.
- Tizado Morales E.J., Núñez Pérez E. y Nieto Nafría J. M. 1992. Reservorios silvestres de parasitoides de pulgones del género *Aphis* con interés agrícola en la provincia de León. (Hym., Braconidae: Aphidiinae; Hom., Aphididae). Departamento de Biología Animal, Universidad de León, 24071 León. *Bol. San. Veg. Plagas*, 18: 309-313.
- Toledo A.V., Giambelluca L., Marino de Remes Lenicov A.M., López Lastra C.C. 2008. Pathogenic fungi of planthoppers associated with rice crops in Argentina. *Int. J. Pest. Manage.*, 54: 363–368.
- Tymon A.M., Pell J.K. 2005. ISSR, ERIC and RAPD techniques to detect genetic diversity in the aphid pathogen *Pandora neoaphidis*. *Mycol. Res.*, 109: 285-293.
- Tymon A.M., Shah P.A., Pell J.K. 2004. PCR-based molecular discrimination of *Pandora neoaphidis* isolates from related entomopathogenic fungi and development of species-specific diagnostic primers. *Mycol. Res.*, 108: 419-433.

- Vasicek A., La Rossa F., Ramos S., Noriega A. 1998. Efecto de la temperatura sobre el «pulgón del repollo» (*Brevicoryne brassicae* L.) (Homoptera: Aphidoidea). Revista de la Facultad de Agronomía UBA 18: 99-103.
- Ves Losada J.C. y Leguizamón E. 2004. Identificación de un nuevo pulgón en trigo y raigrás anual. En: Trigo. Actualización 2004. Boletín de Divulgación Técnica N° 83. INTA EEA Anguil “Ing. Agr. Guillermo Covas”, p 38-40
- Ves Lozada J.C., Dreussi L.W. y Casagrande G. 1977. Variación del nivel de la población de pulgones en trigo, avena y triticale. Anguil. E.E.R.A. Informativo de tecnología Agropecuaria para la región Semiárida Pampeana N ° 69 . Págs. 8 10.
- Viglizzo E. & Roberto Z. 1998. On trade-offs in low-input agro-ecosystems. *Agricult. Sys.*, 56: 253-264.
- Wackers F.L. 2004. Assessing the suitability of flowering herbs as parasitoid food sources: flower attractiveness and nectar accessibility. *Biol. Control.*, 29: 307-314.
- Wade M.R., Zalucki M.P., Wratten S.D., Robinson K.A. 2008. Conservation Biological Control of arthropods using artificial food sprays: current status and future challenges. *Biol. Control.*, 45: 185-199.
- Wells M.L., McPherson R.M., Ruberson J.R. and Herzog G.A. 2000. Effect of fungicide application on activity of *Neozygites fresenii* (Entomophthorales: Neozygiteaceae) and cotton aphid (Homoptera: Aphididae) suppression. *J. Econ. Entomol.*, 93: 1118-1126.
- White A., Watt A.D., Hails R.S., Hartley S.E., 2000. Patterns of spread in insect-pathogen systems: the importance of pathogen dispersal. *Oikos* 89, 137–145.
- Wilding N. 1969. Effect of humidity on the sporulation of *Entomophthora aphidis* and *E. thaxteriana*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 53: 126-131.
- Wilding N., Perry J.N., 1980. Studies on *Entomophthora* in populations of *Aphis fabae* on field beans. *Ann. App. Biol.*, 94, 367-378.

- Wraight S.P., Poprawski T.J., Meyer W.L., Peairs F.B. 1993. Natural enemies of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) and associated cereal aphid species in springplanted wheat and barley in Colorado. *Environ. Entomol.*, 22: 1383–1391.
- Wratten S, Berndt L, Gurr G, Tylianakis J, Fernando J, Didham PR. 2002. Adding floral diversity to enhance parasitoid fitness and efficacy. 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods. Honolulu, Hawaii, USA.
- Zumoffen L, Salto C, Salvo A. 2012. Preliminary study on parasitism of aphids (Hemiptera: Aphididae) in relation to characteristics of alfalfa fields (*Medicago sativa* L.) in the Argentinean Pampas. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 159: 49-54.



**APÉNDICE**

**APÉNDICE**Medios de cultivoSabouraud dextrosa agar con extracto de levadura (SDYA) (Goettel & Inglis 1997)

Peptona	10 grs.
Dextrosa	20 grs.
Agar	20grs.
Agua destilada	1 L.
Extracto de levadura	10 grs.*

(\* al 1 %).

Sabouraud dextrosa agar enriquecido con yema de huevo y leche (SEMA)

(Papierok and Hajek 1997).

SDYA	800 ml
Leche descremada estéril	8 ml
Yemas de huevo estériles	5 u

ColorantesAceto-orceína (colorante vital) (Humber 1997)

Orceína (naturalo sintética)	1 gr.
Ácido acético glacial	45 ml

AntibióticosCloranfenicol-Gentamicina

Cloranfenicol	250 mg/50 ml de agua destilada estéril
Gentamicina	25 mg/50 ml de agua destilada estéril

Penicilina-Estreptomicina

Penicilina	1.150 mg/50 ml de agua destilada estéril
Estreptomicina	528.5 mg/50 ml de agua destilada estéril

Datos metereológicos

- Estación Meteorológica de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela

Tabla i: Datos de temperatura media diaria (promedio de tres observaciones diarias) (°C) registrada en la EEA Rafaela, durante el año 2010.

Día	E	F	M	A	M	J	JL	A	S	O	N	D
1	23,2	23,8	24,5	25,1	20,6	11,1	15,6	9,0	9,0	9,8	24,1	25,2
2	27,1	29,2	21,6	16,8	18,5	11,9	19,6	8,2	7,8	10,5	27,6	24,6
3	29,3	31,2	22,6	18,5	17,1	15,9	20,3	6,5	8,2	15,5	28,3	24,5
4	29,2	23,1	25,9	17,8	19,2	10,7	23,8	5,4	12,1	17,0	19,5	24,4
5	32,4	25,1	27,0	16,2	20,1	13,9	20,0	17,7	13,6	19,3	23,5	24,4
6	21,8	25,3	27,0	17,7	16,5	16,2	16,1	9,9	16,5	20,6	26,7	25,8
7	20,8	30,2	27,1	19,0	13,3	14,3	12,1	11,5	17,8	15,9	32,2	25,8
8	24,3	26,8	26,1	19,2	13,0	13,9	12,0	12,1	18,2	14,2	16,1	23,7
9	26,2	27,8	26,6	20,2	14,8	11,2	12,4	11,8	20,3	17,0	17,3	24,2
10	27,7	26,0	25,5	21,3	12,8	9,6	14,5	12,8	21,8	18,3	21,1	26,9
11	28,8	28,3	29,6	22,3	13,7	11,2	17,9	12,1	16,7	18,0	22,5	24,5
12	19,2	30,0	18,9	23,3	15,6	15,7	5,4	11,7	13,3	19,3	22,8	17,6
13	23,8	25,1	23,1	17,9	17,2	16,5	7,2	6,5	14,2	19,0	22,2	16,4
14	26,7	24,0	23,5	12,2	18,0	19,0	7,0	7,7	12,8	19,1	23,1	22,4
15	25,0	22,5	22,6	14,7	12,2	13,8	4,8	9,4	10,7	14,2	24,2	23,4
16	26,1	21,9	23,9	18,0	10,1	14,1	4,8	12,9	15,4	15,3	21,9	24,5
17	29,1	22,5	27,3	22,0	11,5	13,5	5,7	18,6	14,7	14,6	23,5	28,0
18	23,2	28,3	23,4	26,2	14,2	15,8	4,3	19,7	14,2	18,8	24,7	22,9
19	24,2	30,5	23,5	24,9	15,3	12,0	6,8	17,1	18,2	20,0	17,6	19,7
20	27,3	25,2	24,8	21,3	18,3	9,6	9,8	18,2	21,8	20,8	24,4	24,0
21	28,2	26,1	24,4	19,8	16,5	11,3	9,3	18,7	21,4	22,7	27,0	25,6
22	27,7	28,6	22,2	18,3	18,4	13,4	7,1	22,1	20,0	19,6	23,4	22,2
23	26,9	23,4	21,8	14,2	16,1	16,1	10,2	20,5	18,4	16,9	22,8	27,8
24	27,3	21,1	23,0	14,7	13,0	15,5	9,7	15,4	16,0	17,4	25,9	25,6
25	28,5	19,7	22,1	15,9	15,2	12,9	9,5	14,8	16,0	17,2	27,9	26,0
26	28,9	20,2	24,0	16,3	15,3	11,5	11,1	14,5	18,8	18,0	29,4	26,4
27	29,1	22,1	26,2	17,1	15,3	11,2	13,1	16,9	15,5	19,6	24,8	28,6
28	29,7	23,0	25,3	18,4	15,6	8,6	12,4	22,4	14,3	21,9	22,0	28,4
29	30,8		25,3	18,4	14,3	9,2	14,6	15,3	15,2	15,8	22,6	27,9
30	25,0		26,5	17,8	11,2	13,3	15,7	10,8	12,2	14,0	26,9	26,0
31	24,4		25,9		10,1		9,1	13,1		17,8		26,0

Tabla ii: Datos de humedad relativa (%) registrada en la EEA Rafaela, durante el año 2010.

Humedad relativa (%)

DIA	E	F	M	A	M	J	JL	A	S	O	N	D
1	86	93	73	74	59	71	84	61	73	67	70	68
2	65	84	91	89	81	73	77	63	70	67	68	67
3	70	70	82	71	88	77	73	64	69	66	67	67
4	83	88	75	66	66	92	63	70	67	68	67	68

<b>5</b>	73	88	71	62	72	63	81	62	72	67	69	68
<b>6</b>	61	87	72	68	56	61	92	65	79	72	75	73
<b>7</b>	71	82	73	67	54	69	66	64	65	65	65	65
<b>8</b>	79	80	71	67	58	78	57	61	59	60	60	60
<b>9</b>	86	69	73	66	50	68	67	65	66	66	66	66
<b>10</b>	81	80	81	61	60	71	78	53	66	59	62	61
<b>11</b>	77	70	62	61	60	84	62	68	65	67	66	66
<b>12</b>	69	68	90	66	65	83	48	70	59	65	62	63
<b>13</b>	59	86	81	85	74	87	52	63	58	60	59	60
<b>14</b>	56	86	57	84	76	79	52	73	63	68	65	66
<b>15</b>	68	89	56	73	89	83	71	68	70	69	69	69
<b>16</b>	60	85	61	69	79	86	60	65	63	64	63	63
<b>17</b>	63	79	68	77	76	93	63	59	61	60	61	
<b>18</b>	89	80	90	75	78	93	84	65	75	70	72	
<b>19</b>	84	75	90	79	88	81	65	42	54	48	51	
<b>20</b>	67	91	85	67	86	75	53	41	47	44	46	
<b>21</b>	63	88	84	66	93	65	64	70	67	69	68	
<b>22</b>	67	80	66	59	80	55	60	67	64	65	64	
<b>23</b>	62	79	66	68	93	72	56	64	60	62	61	
<b>24</b>	64	71	65	75	87	48	73	42	58	50	54	
<b>25</b>	69	63	70	72	62	50	63	58	61	59	60	
<b>26</b>	71	76	80	69	72	73	54	76	65	71	68	
<b>27</b>	66	70	78	66	81	69	44	83	64	73	68	
<b>28</b>	65	69	78	63	93	57	48	68	58	63	61	
<b>29</b>	59		71	64	88	91	62	46	54	50	52	
<b>30</b>	89		66	63	74	82	76	71	74	72	73	
<b>31</b>	92		64		77		49	89		89		

Tabla iii: Datos de temperatura media diaria (promedio de tres observaciones diarias) (°C) registrada en la EEA Rafaela, durante el año 2011.

<b>Día</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>J</b>	<b>JL</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>O</b>	<b>N</b>	<b>D</b>
<b>1</b>	26,7	22,8	22,6	25,3	12,2	15,4	5,6	3,2	14,4	17,0	20,0	21,2
<b>2</b>	27,6	25,7	23,6	23,3	9,3	16,6	5,5	9,1	18,0	18,8	23,9	23,5
<b>3</b>	26,9	28,5	25,0	24,8	13,2	12,2	5,1	9,4	22,8	16,1	25,8	25,3
<b>4</b>	26,2	25,6	24,9	20,4	15,9	10,3	8,1	8,3	15,7	13,3	27,6	25,8
<b>5</b>	24,2	29,1	24,1	21,9	17,2	12,4	6,9	13,2	15,7	16,7	26,9	24,2
<b>6</b>	28,3	25,1	25,3	24,9	17,8	11,0	8,0	14,5	16,6	21,9	26,8	28,5
<b>7</b>	24,5	21,1	25,7	24,1	19,4	8,8	10,5	15,8	16,6	19,1	27,9	26,4
<b>8</b>	26,7	20,2	27,1	20,1	16,0	11,2	13,1	13,4	15,8	18,1	29,9	26,3
<b>9</b>	26,8	22,0	28,3	18,4	15,6	13,7	13,9	15,2	18,8	16,6	22,8	28,4
<b>10</b>	23,2	21,9	27,4	20,7	18,9	15,0	16,0	18,6	18,3	18,9	19,1	28,1
<b>11</b>	26,9	23,8	27,8	21,8	19,5	16,6	17,1	21,1	16,6	20,6	19,9	28,7
<b>12</b>	27,7	25,6	22,0	22,5	19,9	15,9	17,9	22,6	21,4	17,2	24,0	24,1
<b>13</b>	28,7	26,5	15,0	24,6	17,5	10,6	16,6	14,8	17,0	19,6	22,3	25,2
<b>14</b>	30,7	25,6	17,9	19,0	15,8	10,8	19,2	12,9	18,3	19,5	21,5	23,2
<b>15</b>	32,4	25,0	20,4	17,0	15,3	18,9	18,0	15,2	21,0	18,8	22,9	24,6
<b>16</b>	30,1	25,8	22,0	18,3	15,4	19,7	12,9	12,7	20,3	24,0	24,8	24,4
<b>17</b>	23,6	28,0	21,5	17,6	16,0	12,9	11,7	12,8	16,7	20,2	26,2	25,5
<b>18</b>	27,5	23,2	20,4	16,0	16,9	17,2	13,2	12,4	14,5	21,2	27,0	30,5
<b>19</b>	26,3	22,0	21,8	17,3	17,5	16,5	8,1	8,4	16,2	20,1	27,1	34,2

20	24,4	23,4	22,9	17,4	18,7	14,2	7,9	8,0	17,5	22,8	21,0	32,8
21	25,4	25,4	23,7	18,4	19,5	11,4	8,0	8,3	19,4	23,3	18,8	34,9
22	27,9	23,5	26,4	22,5	20,0	11,7	8,1	6,4	18,8	18,7	24,0	27,3
23	30,1	22,9	17,5	16,2	13,5	10,3	12,3	9,3	12,3	16,6	25,0	20,2
24	31,4	23,2	18,5	18,1	14,6	10,9	17,1	12,9	17,7	18,3	29,5	19,4
25	26,6	21,1	19,3	19,1	11,9	6,5	21,3	12,4	20,9	17,6	28,2	21,6
26	25,5	23,5	18,7	21,1	13,0	3,9	11,7	13,2	24,1	14,2	28,2	25,6
27	28,4	24,5	18,1	21,3	12,3	7,4	14,7	16,5	24,8	19,5	31,9	28,3
28	27,8	23,2	19,4	23,0	17,4	8,4	15,7	12,6	25,9	22,6	24,0	27,1
29	28,6		20,0	14,7	13,2	10,5	12,3	14,6	24,0	17,5	29,0	25,6
30	26,1		22,3	13,2	14,7	7,1	7,5	13,8	15,2	19,9	19,0	27,8
31	23,1		24,7		14,2		6,3	13,1		18,9		28,7

Tabla iv: Datos de humedad relativa (%) registrada en la EEA Rafaela, durante el año 2011.

DIA	E	F	M	A	M	J	JL	A	S	O	N	D
1	70	84	75	S/D	69	67	48	95	51	87	59	46
2	61	80	71	S/D	74	79	61	70	51	61	62	44
3	65	84	77	S/D	68	85	58	56	57	59	54	44
4	75	85	71	S/D	72	67	66	62	57	90	60	50
5	66	78	70	S/D	71	61	76	54	33	80	72	62
6	50	90	74	S/D	65	94	58	61	36	76	69	43
7	74	98	75	S/D	70	92	55	69	40	90	66	46
8	71	98	70	S/D	68	85	57	94	47	84	58	46
9	55	92	67	S/D	74	81	65	95	42	73	82	47
10	71	93	69	S/D	84	80	71	83	45	66	46	51
11	53	90	65	S/D	91	59	85	78	49	75	60	42
12	56	91	84	S/D	85	76	85	71	48	89	59	45
13	52	89	65	S/D	88	69	70	55	53	83	63	31
14	51	83	62	S/D	83	82	95	53	47	71	68	62
15	48	78	70	S/D	79	87	85	85	62	65	51	64
16	58	S/D	76	S/D	78	82	65	87	82	52	51	64
17	54	S/D	86	S/D	74	91	82	74	57	61	49	53
18	57	S/D	59	S/D	70	96	83	85	56	65	49	41
19	81	S/D	53	S/D	66	88	77	62	68	78	69	35
20	59	S/D	60	S/D	69	92	81	36	64	68	93	34
21	65	S/D	58	S/D	70	94	74	58	56	59	82	35
22	52	S/D	82	S/D	77	93	68	69	69	85	47	76
23	61	S/D	96	S/D	58	83	70	63	76	93	58	89
24	61	S/D	91	S/D	96	75	70	68	66	94	57	50
25	85	S/D	96	S/D	88	83	61	56	62	78	53	55
26	85		79	S/D	76	68	56	72	60	83	56	60
27	77		67	S/D	84	60	65	76	59	48	56	46
28	81		71	S/D	74	56	70	75	57	64	78	51
29	75		71	S/D	75	53	66	61	55	70	61	52
30	89		70	S/D	79	51	72	51	83	58	58	46
31	94		75		74		71	41		58		44

- Estación Meteorológica El Pozo, FICH, UNL

Tabla v: Datos de temperatura media diaria (promedio de tres observaciones diarias) (°C) registrada en la Estación meteorológica El Pozo, durante el año 2010.

Día/Mes	E	F	M	A	M	Jn	Jl	A	S	O	N	D
1	24.1	25.2	24.8	25.3	19	12	14.9	7.1	12.1	11.6	21.6	26.4
2	27.7	28.7	24.6	18.3	18.3	13.1	18.5	7.3	10.4	11.8	25.1	23.8
3	30	31.6	23.9	19.1	18.7	15.9	19.8	7.7	9.2	14.7	26.9	26.2
4	30.1	23.5	25.7	17.2	18.8	15.1	20.6	6.9	12.6	17.3	20.4	23.9
5	31.4	26.1	26.7	16.4	19	13.9	21.3	7.8	15.9	20	20.8	25.3
6	24.9	25.5	27.3	18.2	17.4	15.3	16.6	11.1	17.6	19.9	23.9	28
7	23	28.9	27.2	19	13.9	14	13.1	12.7	18.7	16.5	28	26.3
8	24.8	28.5	26.2	19.3	12.7	14	10.7	12.5	19.1	15.9	17.6	24.6
9	27.4	28.5	27.3	19.9	13.4	11.3	11.2	12.1	21.5	17.7	16.5	24.2
10	28.1	28.8	27.2	20.9	14	10.6	12.9	12.6	21.8	18.2	19.1	25.2
11	29.3	30.1	25.9	22.3	14.1	11.2	16.2	9.7	18.5	18.6	20.3	24.8
12	23.9	30.7	21.1	23	15.6	15.2	6.1	12.1	15.3	20.8	21.1	16.3
13	24.5	27.8	22.5	19.7	17.2	16.2	7.5	7.5	14.2	18.7	20.5	19.8
14	27.4	26.5	23.4	13.4	18.4	18.4	8.5	7.1	14.4	19.3	20.7	24.9
15	26.3	23.7	21.7	14.4	15.1	13.9	7	9.2	17.4	14.9	21.9	26.6
16	27.2	22.9	24.5	16.6	12.2	14.3	6.6	12.3	17.9	15.6	22	27.2
17	29.1	23.8	26.6	20.4	11.8	14.2	7.4	16.7	15.4	16	22	29.6
18	25.7	27.1	25.3	24.5	15.3	15.2	6.3	18.2	15.1	18.1	21.8	21.3
19	25.2	30	24.4	24.5	17.7	12.9	7.6	17	18.3	21.6	19.3	20.4
20	28.2	25.1	25.4	20.7	19	11.4	10.4	15.3	21.8	23.1	23.6	25.1
21	29.4	26.5	23.1	18.7	19.1	11.1	10.3	18.1	21.7	22.1	25.6	28.2
22	29.6	28.5	22.2	17.6	19.4	12.6	8.9	22.2	19.1	19.6	22.5	31
23	29.1	25.1	22.9	13.8	17.8	14.2	8.7	21.2	17.8	17.3	23.6	30.2
24	28.2	22	24.3	13.4	13.5	15.4	8.5	16.2	16.3	16	25	25.8
25	29.9	20.3	23.2	15	14.3	12.8	9.3	14.7	17.4	19.1	26	28.1
26	28.4	21	23.7	16.1	15.5	12.3	11.5	12.1	20.1	20.4	27.5	29.8
27	30.1	22.6	25.3	16.6	16.2	12.4	12.2	16.6	16.9	20.3	23.4	31.4
28	30.9	23.6	25.4	16.9	17.3	10.3	11.9	19.3	15.4	22.4	21.7	31.4
29	31.7		24.6	17.3	16.3	11.1	12.1	15.7	14.7	17	21.2	28.8
30	28.9		26.4	17.8	13.4	15	14.4	11.3	14.2	16.3	24.9	27.9
31	26.9		26.3		11.9		10.1	14.8		20.3		27.7

Tabla vi: Datos de humedad relativa (%) registrada en la Estación meteorológica El Pozo, durante el año 2010.

Día/Mes	E	F	M	A	M	Jn	Jl	A	S	O	N	D
1	75	92	68	72	64	75	89	62	92	77	54	57
2	71	87	83	88	80	80	82	54	96	57	50	75
3	65	72	76	71	88	84	78	59	83	56	56	59
4	76	89	74	61	82	86	77	67	65	55	77	59
5	77	88	71	61	86	72	76	80	63	64	66	58
6	68	88	68	71	66	68	91	77	67	78	49	54
7	58	81	68	72	50	74	74	75	67	65	49	66
8	71	73	69	73	65	75	67	74	62	63	77	48
9	82	71	76	71	65	67	77	70	73	65	64	47

10	80	74	78	69	65	68	79	62	77	62	53	67
11	76	69	65	72	70	88	79	75	71	56	57	80
12	59	71	76	71	79	89	52	75	68	62	52	67
13	51	81	78	83	83	90	51	68	82	83	57	40
14	58	78	59	73	82	82	65	77	68	85	62	43
15	61	89	52	79	91	89	78	70	60	87	61	55
16	63	79	62	69	69	89	68	71	61	73	66	61
17	64	75	66	78	71	94	64	73	52	63	59	59
18	82	79	93	80	87	92	90	77	55	60	61	86
19	75	81	87	77	87	85	81	58	60	57	83	95
20	63	91	79	71	88	72	59	63	70	62	65	79
21	63	86	82	75	92	69	75	72	68	69	59	63
22	66	83	68	58	91	67	74	70	72	70	73	62
23	63	71	66	68	95	77	66	70	71	52	72	71
24	65	64	67	71	88	61	76	50	71	72	64	79
25	64	53	64	83	69	44	68	58	74	61	52	59
26	73	68	73	81	77	69	55	90	66	55	53	51
27	70	70	79	78	81	81	63	85	80	57	73	52
28	66	62	77	76	92	64	63	84	72	59	59	52
29	66		72	76	94	84	67	56	71	77	49	59
30	77		78	60	76	85	87	66	64	45	58	61
31	80		67		77		59	96				74

Tabla vii: Datos de temperatura media diaria (promedio de tres observaciones diarias) (°C) registrada en la Estación meteorológica El Pozo, durante el año 2011

Día/Mes	E	F	M	A	M	Jn	Jl	A	S	O	N	D
1	27	24.4	25	24.8	14.4	13.3	4.8	4.9	12.3	15.6	20.3	18.7
2	27.1	25.1	25	23.7	13	15.1	5.4	9.4	16.1	18.2	22.9	21.2
3	27.3	28.7	26.3	25.2	14	12.6	4.3	10.3	22.3	15.1	24.7	23.2
4	27.6	27	26.1	21.7	15.6	9.2	6.5	8.7	16.4	13.3	25.8	23.3
5	25.6	27.7	25.9	22.5	16.2	11.7	7.3	13.8	15.5	16.5	27.5	24.9
6	27.7	25.5	26.5	23.5	16.4	11	6.8	13.5	16.7	20.7	26.7	26.3
7	27.7	23.7	27.3	25	18.2	11.1	9.7	14.5	17.9	19	27.7	25.9
8	28.8	20.6	29.5	22.3	17.2	11	11.1	14.9	17.3	17.4	28.3	25.2
9	27.1	22.8	29.4	19.8	15.5	11.7	12.1	16.9	18.6	16.3	22	25.3
10	24.1	21.9	29.2	20.9	18.6	13.7	16	18.8	18.3	17.3	17.2	26.4
11	26.8	24.3	29.1	22.8	19.8	14.7	16.7	21.2	16.6	20.8	19.7	26.5
12	27.2	26.4	24.8	23.6	21	14.6	17.5	23.1	20.7	18.3	22.9	23.3
13	28.5	26.6	16	24.4	17.2	10.7	17.5	14.9	18	16.9	23.1	22.4
14	29.9	25.5	17.7	20.5	16.9	11.9	18	13.9	17.2	18.8	20.5	21.8
15	30.6	25.9	21.7	18.9	16.5	18.2	18.9	14.9	19.6	20.9	20.5	22.1
16	28.2	26.9	23.4	19.8	16.8	19.4	14.1	14.5	20.6	23.3	22.5	22.2
17	23	29.9	22.5	20	16.9	14.4	11.8	13.9	17.3	19.3	24.6	22.9
18	26.5	24.4	20.9	17.6	16.8	17.5	13.5	13.9	13.9	20.2	24.9	27.5
19	26.2	23	20	18.8	18.1	17.6	7.8	10.2	15.3	20.6	25.1	30.4
20	23.2	23.9	21.8	18.5	19.5	15.2	8.7	8.6	16.7	22.2	21	32.3
21	23.7	26.8	28.1	18.3	20.6	11.8	10.3	8.4	18	23	18.9	32
22	25.9	26.4	29.7	22.4	20.5	11.7	11.2	7.8	17.4	19.2	21.4	26.1

23	28.9	23.5	20.5	18	16.1	11.1	12.6	9.6	12.7	16.6	22	20.8
24	31.2	23.6	19.4	18.1	15.3	10.7	16.3	13.9	16.5	18.8	23.9	17.5
25	27.5	23.5	20.1	19.6	13.5	6.5	19.5	12.5	20.3	17.4	25.6	20.2
26	26.8	23.8	20.8	21	13.2	4.6	12.3	14.2	22.6	16	27.2	23.6
27	28.8	25	19.8	21.3	12.8	6.4	14.3	13.9	24.3	17.3	27.1	26.7
28	28.7	25	20.8	22.3	12.9	7.7	16.1	14.1	24.6	21.9	23.9	26
29	28.4		21.2	17.6	12.8	9.1	12.4	14.7	23.9	18.8	27.4	24.6
30	28.3		21.8	14.3	13.8	8.3	7.8	14.3	16.7	18.9	19.5	26.5
31	25.3		23.6		14.5		6.9	11.8		18.3		27

Tabla viii: Datos de humedad relativa (%) registrada en la Estación meteorológica El Pozo, durante el año 2011.

Día/ Mes	E	F	M	A	M	Jn	Jl	A	S	O	N	D
1	81	61	76	83	79	84	72	97	62	95	63	65
2	76	72	79	79	69	90	68	79	61	66	69	67
3	76	83	77	79	78	93	67	57	68	62	73	65
4	81	66	75	71	71	79	70	71	72	91	74	71
5	75	68	73	71	80	74	74	67	59	82	73	72
6	62	74	80	76	80	94	81	78	57	82	80	71
7	70	92	80	78	82	91	66	81	53	90	77	51
8	76	93	71	71	74	94	73	98	60	86	73	58
9	71	86	73	79	80	93	79	95	68	78	84	69
10	78	85	74	83	94	91	80	90	64	75	50	67
11	66	81	73	80	100	81	92	88	62	74	60	66
12	73	81	86	77	89	84	92	81	55	88	67	60
13	68	78	66	80	89	67	84	62	56	90	63	63
14	64	62	66	72	90	84	98	53	51	78	71	77
15	58	66	67	74	87	90	96	86	71	67	66	78
16	76	77	76	87	86	91	73	96	86	59	70	75
17	61	79	90	78	85	98	83	86	73	64	65	72
18	70	97	61	65	84	98	92	92	72	74	65	55
19	85	95	61	78	87	93	81	69	75	79	77	58
20	67	95	70	99	86	94	84	53	70	74	90	55
21	63	88	76	97	79	94	81	64	67	68	86	59
22	63	92	86	90	90	99	84	70	71	90	66	82
23	72	93	99	58	79	86	80	76	88	94	69	93
24	76	88	91	67	98	87	86	83	78	91	73	62
25	94	87	97	69	95	86	80	81	76	83	69	61
26	91	79	83	77	87	78	68	78	75	72	69	73
27	79	76	66	83	82	65	72	86	71	59	68	67
28	81	73	72	82	83	69	75	73	76	70	86	61
29	81		80	94	84	70	78	77	66	76	79	71
30	87		83	86	93	69	77	68	77	60	66	63
31	93		87		88		74	58		55		56

Tabla ix: Datos de temperatura media diaria (°C) y humedad relativa (%) registradas en la Estación Meteorológica El Pozo, durante el mes de diciembre del año 2012.

---

Día/Mes	Temp. (°C)	HR (%)
1	22,6	75
2	26,3	50
3	22,3	77
4	25,5	83
5	27	86
6	29,4	81
7	20,3	68
8	22,1	62
9	25,7	62
10	26,6	71
11	24,5	69
12	27,4	71
13	25,7	60
14	26,3	66
15	26,4	72
16	25,6	79
17	20,7	71
18	20,5	90
19	22,9	97
20	20,4	86
21	22,1	70
22	24,1	73
23	27,2	79
24	32,4	77
25	26,3	62
26	21,3	60
27	19,7	64
28	21,7	63
29	25,1	67
30	27,8	74
31	24,9	79

Tabla x: Datos de temperatura media diaria (promedio de tres observaciones diarias) (°C) registrada en la Estación meteorológica El Pozo, durante el año 2013.

Día/Mes	E	F	M	A	M	Jn	Jl
1	18,2	30,5	25,9	22,6	20,8	15,5	12,2
2	20,1	26,7	21,7	19,9	21,3	13,3	14,4
3	23,5	22,7	17,1	17,5	21	13,3	18,2
4	27,5	22,1	16,8	18,6	18,2	16,5	19
5	24,9	25	18,9	21,6	19,1	18,6	18,2
6	25,9	25	22,5	18,6	20,1	12,6	14,4
7	28,1	26	22,9	13,8	15,5	13,5	10,5
8	28,2	27,4	25,2	15,9	17,2	13,9	10,4
9	28,3	28,3	25,9	19,7	19,7	14,2	11,5
10	28,3	28,5	23,5	21,2	21,4	15,9	15,4
11	26,7	27,4	20,8	19	20,5	18,2	16,1
12	25,3	29,8	19,9	18	18,7	19,6	14,2
13	25,8	25,6	16,3	14,1	19,2	21,9	14,8
14	26,2	25,8	13,8	18,3	19,5	16,9	14
15	27,7	28,6	16,5	22,5	11,8	13,1	13,4
16	29,1	28,2	15,8	21,8	9,2	13,1	16
17	28	21,7	14,6	20,9	9,8	11,2	19,5
18	26,8	16,7	17,3	21,1	10,6	13,2	12,5
19	25,1	15,8	16,8	21,1	11,2	7,7	7,7
20	23,4	17,6	19,1	21,2	10,3	6,9	8,9
21	24,3	20,9	20,5	21,7	12,9	8,5	5,3
22	27,6	22,9	22	22,4	12,4	10,7	5,2
23	29,8	25,3	22,5	22,9	13	11,1	5,7
24	27,1	23	23,6	23,2	14	11,1	7,1
25	21,3	18,9	22	23,7	15,1	9,9	9,1
26	21	19,1	20,8	23,4	15,6	11,1	10,6
27	25,3	20,5	19	23,6	17,1	12,7	13,1
28	26,8	23,1	19,1	20,8	21,2	13,9	12,9
29	28		19,6	19,2	17,3	13,3	15,3
30	30,7		23,3	20,7	15,6	11	18,9
31	25		25,9		16		19,2

Tabla xi: Datos de humedad relativa (%) registrada en la Estación meteorológica El Pozo, durante el año 2013.

Día/Mes	E	F	M	A	M	Jn	Jl
1	58	75	70	88	94	84	78
2	60	71	82	95	98	81	70
3	65	53	85	86	87	75	87
4	77	61	77	81	82	66	96
5	91	62	73	69	83	66	96
6	84	55	72	68	71	69	93
7	79	62	74	61	63	80	80
8	79	65	80	67	73	80	72

---

9	76	62	86	69	79	94	90
10	71	71	79	79	83	97	99
11	63	73	83	97	81	91	96
12	64	59	85	78	89	95	96
13	62	64	84	67	97	92	89
14	60	75	85	64	95	87	76
15	64	66	72	72	75	88	76
16	64	72	71	79	66	90	74
17	70	88	72	79	75	85	80
18	66	92	70	81	90	90	75
19	71	93	88	78	96	56	63
20	64	98	89	78	97	64	61
21	61	84	83	77	88	73	62
22	62	77	81	81	90	69	65
23	71	79	81	85	90	83	58
24	79	91	77	81	86	87	63
25	67	78	77	77	90	86	69
26	57	66	68	75	91	88	73
27	67	66	69	87	91	83	83
28	64	68	72	87	90	95	83
29	62		77	84	72	84	81
30	67		79	85	55	78	76
31	85		74		69		89

---