



**Hongos patógenos de la “mosca blanca” (Hemiptera: Aleyrodidae)
Diversidad, patología y variación estacional
en cultivos hortícolas**

**Trabajo de investigación para optar por el título de
Doctor en Ciencias Naturales**

Lic. D'Alessandro Celeste Paola

**Directora: Dra. López Lastra Claudia C.
Co-director: Dr. Sosa-Gómez Daniel R.**

A Fernando Martin, mi gran compañero de vida

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la **Dra. Claudia López Lastra** por abrirme las puertas al estudio de hongos entomopatógenos y por ser una muy buena amiga y compañera en estos años de trabajo.
- ❖ Al **Dr. Juan García** por sus viajes semanales al campo, y su orientación en los aspectos de la investigación científica.
- ❖ Al **Dr. Daniel Sosa-Gómez y familia** por ayudarme y acompañarme en mi proyecto de investigación y en mi estadía en la ciudad de Londrina, Brasil.
- ❖ A mis compañeras y amigas del laboratorio en el CEPAVE: **Alejandra Gutiérrez, Lorena Jurado, Belén Cabrera, Silvana Tongiani**, y a las que están un poco mas lejos, **María Elena Schapovaloff, Patricia Albornoz Medina y Romina Manfrino**, que fueron una excelente compañía y ayuda en todo momento.
- ❖ A mis compañeros del laboratorio en el EMBRAPA, Londrina, Brasil: **Jairo Da Silva y Silvia Cavaguchi, Gloria Patricia Castillo, Larissa Giroto y Silvana Rockenbach Marin**, que me guiaron con las técnicas de biología molecular y me hicieron pasar excelentes momentos durante mi estadía en Brasil.
- ❖ A **Marcelo Maita, Mariana Del Pino, Susana Martínez** y a todos los productores y profesionales de las quintas hortícolas que me permitieron el ingreso a sus casas y el trabajo en sus plantaciones.
- ❖ A **Susana Padín** por su ayuda y colaboración con los ensayos con funguicidas.
- ❖ A **Marcelo Asborno** por el envío del Boletín Agrometeorológico mensual de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
- ❖ A **María Inés Urrutia, Patricia Pereyra y Arnaldo Maciá** por la realización y colaboración con los análisis estadísticos.
- ❖ A **Marcela Schneider** por su ayuda y colaboración en la construcción de las colonias de “mosca blanca”.
- ❖ A los profesionales y directivos de las **Colecciones Micológicas de ARSEF, EMBRAPA y CEPAVE** por permitir el ingresos de mis aislamientos fúngicos y llevar a cabo la preservación de los mismos.
- ❖ A la directora del CEPAVE, **Dra. Alda González**, y a la co-directora, **Dra. Graciela Navone**, por haberme permitido la realización de mis tareas de investigación en dicho centro.

- ❖ A todos los **integrantes del CEPAVE** que de una u otra manera me ayudaron y compartieron conmigo el desarrollo de las tareas de investigación.
- ❖ A los miembros del **CONICET, ANPCyT, Becas Wood Whelan** y **UNLP** por financiar mi tesis doctoral y permitir mi formación científica en el área de las Ciencias Biológicas.
- ❖ A mi gran amor, **Fernando Martín**, por su apoyo incondicional en todo lo que hago, por su paciencia infinita y por ser el mejor compañero de vida.
- ❖ A mi hermana, **Luciana D'Alessandro**, por su ayuda incondicional en todo lo relacionado al diseño gráfico como el diseño de las carátulas de la tesis, los folletos para extensión, los pósters, las tarjetas, logos para congresos, etc.
- ❖ A **mis padres, hermana, abuelos, tíos, primos y amigos**, que me acompañan en todo momento y que siempre me alientan a seguir adelante.

INDICE

Resumen	2
Abstract	6
INTRODUCCION	10
<hr/>	
1. ANTECEDENTES	14
<hr/>	
1.1. Características de la “mosca blanca”	14
1.2. Daños ocasionados por la “mosca blanca”	16
1.3. Especies de “mosca blanca” de mayor impacto económico	17
1.4. Métodos de control para la “mosca blanca”	19
1.5. Hongos entomopatógenos: características biológicas	22
1.6. Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos	23
1.7. Caracterización e identificación de los hongos entomopatógenos	26
1.8. Los hongos entomopatógenos como agentes potenciales del control biológico	29
1.9. Desarrollo de micoinsecticidas a base de hongos entomopatógenos	30
1.10. Interacción de los hongos entomopatógenos con productos fitosanitarios	32
1.11. Hongos patógenos de “mosca blanca”	34
1.12. Situación actual de la “mosca blanca” en la Argentina	36
Hipótesis	40
Objetivos propuestos	40
<hr/>	
2. MATERIALES Y METODOS	42
<hr/>	
2.1. Área de Estudio	42
2.2. Cultivos hortícolas	42
2.3. Tipo de muestreos	45
2.4. Recolección de insectos y detección de infecciones	46
2.5. Identificación y preservación de los insectos	47
2.6. Aislamiento de los hongos entomopatógenos	47
2.6.1. Aislamiento a partir del insecto infectado	47

2.6.2. Aislamiento a partir de muestras de suelo	47
2.7. Procedimientos con cultivos fúngicos	48
2.7.1. Metodología de aislamiento monospórico	48
2.7.2. Ensayo de viabilidad	49
2.7.3. Determinación del crecimiento radial y tasa de crecimiento	50
2.8. Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por caracteres morfológicos	51
2.8.1. Descripción macroscópica	51
2.8.2. Descripción microscópica	51
2.8.3. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad y el crecimiento radial	51
2.8.4. Análisis estadísticos	52
2.9. Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por medio de técnicas moleculares	53
2.9.1. Preparación del material fúngico	53
2.9.2. Extracción de ADN	53
2.9.3. Amplificación y secuenciamiento de dos genes nucleares	54
2.9.4. Perfil de restricción de EF1- α e ITS1-5,8S-ITS2	55
2.10. Preservación de cultivos fúngicos	56
2.10.1. En glicerol 10 % estéril	56
2.10.2. En agua destilada estéril	57
2.10.3. En papel de filtro esterilizado	57
2.10.4. Transferencias en cultivo o “repiques” sucesivos	57
2.11. Evaluación de la patogenicidad de los hongos	57
2.11.1. Cría artificial de “mosca blanca”	57
2.11.2. Selección del aislamiento fúngico de mayor patogenicidad	58
2.11.3. Susceptibilidad de los estados de desarrollo de <i>T. vaporariorum</i> al aislamiento fúngico seleccionado	59
2.11.4. Estimación de la concentración letal 50 y 90 (CL ₅₀ y CL ₉₀)	62
2.11.5. Evaluación de la susceptibilidad de ninfas de <i>T. vaporariorum</i> parasitadas con <i>Eretmocerus</i> sp. al hongo entomopatógeno <i>I. fumosorosea</i>	62
2.11.6. Análisis estadísticos	63

2.12. Evaluación de la interacción de <i>I. fumosorosea</i> con fungicidas	63
2.12.1. Selección de los fungicidas y su preparación	63
2.12.2. Ensayo de viabilidad con fungicidas	64
2.12.3. Crecimiento radial en contacto con fungicidas	65
2.12.4. Ensayos de patogenicidad en presencia de fungicidas	66
2.12.5. Análisis estadísticos	66
2.13. Producción masiva del aislamiento CEP 315 de <i>I. fumosorosea</i>	67
2.13.1. Selección de sustratos para la producción masiva de <i>I. fumosorosea</i> (CEP 315)	67
2.13.2. Evaluación del rendimiento de los conidios	68
2.13.3. Evaluación de la viabilidad de los conidios	68
2.13.4. Análisis estadísticos de los datos	68
2.13.5. Elaboración de una suspensión de conidios de <i>I. fumosorosea</i> (CEP 315) a partir de la producción masiva (S.C.P.M)	69
2.13.6. Susceptibilidad de los estados de desarrollo de <i>T. vaporariorum</i> a la S.C.P.M de <i>I. fumosorosea</i> (CEP 315)	72
2.13.7. Estimación de la concentración letal 50 y 90 de la S.C.P.M	73
2.14. Aplicación del aislamiento CEP 315 de <i>I. fumosorosea</i> en cultivos hortícolas	74
2.15. Persistencia del aislamiento CEP 315 de <i>I. fumosorosea</i> en el suelo	77
<hr/>	
3. RESULTADOS	79
<hr/>	

3.1. Prospección y variación estacional de hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas

3.1.1. Relevamiento de individuos de “mosca blanca” y hongos entomopatógenos	79
3.1.2. Monitoreo de las poblaciones de “mosca blanca” en cultivos hortícolas	81
3.1.3. Prospección de hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas orgánicos y convencionales	87
3.1.4. Variación estacional y prevalencia de hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas	91

3.2. Aislamiento, caracterización e identificación de los hongos patógenos de “mosca blanca”

3.2.1. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos a partir de individuos de “mosca blanca” infectados	94
3.2.2. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos a partir de muestra de suelo	96
3.2.3. Caracterización morfológica de los hongos patógenos de “mosca blanca”	97
3.2.4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial y la viabilidad de <i>I. fumosorosea</i> (CEP 315)	101
3.2.5. Caracterización de los hongos patógenos de “mosca blanca” por técnicas de biología molecular	103

3.3. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos sobre individuos de “mosca blanca”

3.3.1. Selección del aislamiento fúngico más patogénico para <i>T. vaporariorum</i> y <i>B. tabaci</i>	111
3.3.2. Evaluación de la susceptibilidad de todos los estados de desarrollo de <i>T. vaporariorum</i> al aislamiento CEP 315 de <i>I. fumosorosea</i>	115
3.3.3. Determinación de las concentraciones letales del aislamiento CEP 315 de <i>I. fumosorosea</i>	117
3.3.4. Evaluación de la susceptibilidad de las ninfas de <i>T. vaporariorum</i> parasitadas con <i>Eretmocerus</i> sp. al aislamiento CEP 315 de <i>I. fumosorosea</i>	117

3.4. Interacción de los aislamientos CEP 304 y CEP 315 con fungicidas comerciales

3.4.1. Efecto de los fungicidas sobre el porcentaje de germinación de los aislamientos CEP 304 y CEP 315	119
3.4.2. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento radial y la tasa de crecimiento de CEP 304 y CEP 315	121

3.4.3. Efecto de los fungicidas sobre la patogenicidad de CEP 304 y CEP 315 en ninfas de <i>T. vaporariorum</i>	125
3.5. Producción masiva de <i>I. fumosorosea</i> (CEP 315) y su aplicación en cultivos hortícolas	
3.5.1. Selección de sustratos de producción masiva de <i>I. fumosorosea</i> (CEP 315)	128
3.5.2. Elaboración de una suspensión de conidios de <i>I. fumosorosea</i> (CEP 315) a partir de la producción masiva (S.C.P.M)	134
3.5.3. Susceptibilidad de individuos de <i>T. vaporariorum</i> a la S.C.P.M de <i>I. fumosorosea</i> (CEP 315)	135
3.5.4. Aplicación de la S.C.P.M de <i>I. fumosorosea</i> (CEP 315) en cultivos hortícolas	139
3.5.5. Persistencia de los conidios de <i>I. fumosorosea</i> (CEP 315) en el suelo	145
<hr/> 4. DISCUSIÓN	147
<hr/> 5. CONCLUSIONES	159
<hr/> 6. PERSPECTIVAS FUTURAS	163
<hr/> 7. BIBLIOGRAFIA	165
<hr/> ANEXO	190

RESUMEN



RESUMEN

En la República Argentina, la “mosca blanca” es considerada una de las plagas más importantes en la producción agrícola nacional. Una de las especies predominantes de “mosca blanca” es *Bemisia tabaci* (Gennadius), la cual ha sido citada en la provincia de Santiago del Estero, Tucumán, Corrientes, Entre Ríos y Buenos Aires, afectando plantaciones de soja, algodón y cultivos hortícolas. Otra especie que se destaca en nuestro país es *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) que se encuentra mayoritariamente en cultivos hortícolas bajo cubierta ubicados en la provincia de Santa Fe y Buenos Aires.

El método de control más utilizado para la “mosca blanca” es la aplicación de insecticidas químicos, sin embargo, este tipo de manejo presenta grandes problemas, porque esta plaga desarrolla resistencia a varios insecticidas, a lo cual se suma el impacto de estos productos sobre el medio ambiente. En las últimas décadas surgió un creciente interés en el desarrollo de métodos alternativos, como por el ejemplo el uso de hongos entomopatógenos. Estos hongos son considerados excelentes candidatos como agentes de control biológico, ya que pueden infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula, presentan dispersión activa y pasiva, persistencia en el medio, tolerancia a factores adversos debido al desarrollo de esporas de resistencia, y su manipulación en cultivos *in vitro* es relativamente fácil. En la Argentina existen varias referencias sobre la presencia y el uso de hongos patógenos de insectos plaga, sin embargo, existen pocos estudios referentes a los hongos patógenos de la “mosca blanca”. En base a este contexto se decidió plantear como objetivo general el estudio de la diversidad, patogenicidad y variación estacional de los hongos patógenos de la “mosca blanca” en cultivos hortícolas de la República Argentina.

En primer lugar, se realizó una prospección y determinación de la variación estacional de los hongos entomopatógenos durante dos años consecutivos de muestreo (2007-2009), detectando la presencia de adultos de *T. vaporariorum* infectados con *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith durante los meses de mayo, junio y octubre del 2007 en Colonia Urquiza, provincia de Buenos Aires. Se obtuvieron 20 aislamientos *in vitro* de hongos entomopatógenos a partir de insectos infectados y de muestras de suelo, los hongos se ubicaron taxonómicamente en el Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales, Familia Cordycipitaceae, de los cuales 17 fueron identificados como *I. fumosorosea* (Wize) Brown & Smith, 2 como *Beauveria bassiana*

(Balsamo) Vuillemin, y uno como *Lecanicillium* sp. Gams & Zare. La caracterización e identificación de las especies fúngicas se llevó a cabo mediante descripción de las características morfológicas y por técnicas moleculares. La amplificación de dos genes nucleares (el factor de elongación 1 alfa y los espaciadores transcritos internos de los genes ribosomales) y la subsiguiente digestión con enzimas de restricción (RFLP-PCR) permitió confirmar la identificación de los aislamientos de *I. fumosorosea* provenientes de adultos de *T. vaporariorum*.

La patogenicidad fue evaluada en condiciones controladas de laboratorio y se observó que todos los aislamientos de *I. fumosorosea* causaron porcentajes de mortalidad superiores al 70% y 80% para ninfas de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*, respectivamente, siendo la cepa CEP 315 la más patogénica, ya que causó un 100 % de mortalidad para ambas especies de “mosca blanca”. Luego, se evaluó la susceptibilidad de todos los estados de desarrollo de *T. vaporariorum* al aislamiento CEP 315, obteniendo como resultado que los adultos y las ninfas II y III fueron los estadios más susceptibles, ya que alcanzaron porcentajes de mortalidad de 59,7%, 49,7% y 50,3%, respectivamente, mientras que las ninfas I y IV presentaron porcentajes de mortalidad inferiores (9,4% y 5,6%, respectivamente). Además, se determinó el efecto de CEP 315 sobre ninfas de *T. vaporariorum* parasitadas con *Eretmocerus* sp. Haldeman (Hymenoptera: Aphelinidae), observándose solo un 20% de infección en las ninfas parasitadas y un 70% de infección en las ninfas no parasitadas.

Se realizaron estudios sobre la interacción de dos aislamientos de *I. fumosorosea* (CEP 304 y CEP 315) con 8 fungicidas comerciales para estimar la compatibilidad con los productos fitosanitarios utilizados en la producción agrícola. Los fungicidas Propamocarb 0,15 % y *Trichoderma harzianum* 0,5 % no presentaron efectos deletéreos sobre la germinación de los conidios, la tasa de crecimiento diaria y la patogenicidad de los aislamientos CEP 304 y CEP 315 de *I. fumosorosea*, por lo tanto, podrían ser recomendados para una aplicación conjunta dentro del manejo integrado de la “mosca blanca”.

Finalmente, se evaluó la producción artesanal del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* y la aplicación de éste en áreas restringidas con producción hortícola bajo cubierta. La producción artesanal se llevó a cabo en sustratos sólidos correspondiendo a arroz integral, arroz parboil, arroz rojo, arroz yamaní, trigo y salvado de trigo. El aislamiento CEP 315 desarrolló un micelio blanco que cubrió completamente todos los sustratos, a excepción del salvado de trigo. Sin embargo, la producción en granos de

arroz presentó un rendimiento de conidios mayor que los granos de trigo y salvado de trigo, por lo tanto, el arroz sería el sustrato más adecuado para la multiplicación de *I. fumosorosea* (CEP 315). La suspensión de conidios obtenida luego de la producción presentó una concentración de $5,89 \times 10^8$ conidios/ml, un 98,7% de germinación y un porcentaje de infección de 24,4%, 25,3 %, 10,5%, 8,8% y 12,5% para las ninfas I, II, III y IV y los adultos de *T. vaporariorum*, respectivamente. La aplicación de ésta suspensión en plantaciones de tomate y berenjena ubicadas bajo cubierta en Los Hornos, partido de La Plata, Buenos Aires, ocasionó la infección de individuos de “mosca blanca” a partir del cuarto día y continuó hasta los 15 días posteriores a la aplicación. El número máximo de individuos infectados se observó en el octavo día, registrando en las plantaciones de berenjena un 3,6% de infección en adultos y un 12,7% en ninfas, mientras que en las plantaciones de tomate un 9,2% para los adultos y 8,2% para las ninfas.

En base a todos los resultados, se puede concluir que los aislamientos de *I. fumosorosea*, obtenidos a partir de infecciones naturales de adultos de *T. vaporariorum*, tendrían condiciones potenciales para ser utilizados como agentes de control biológico de la “mosca blanca” en cultivos de importancia económica en nuestro país.

ABSTRACT



ABSTRACT

In Argentina, the “whitefly” it is considered one of the most important pests in the agricultural production national. One of the predominant species of “whitefly” is *Bemisia tabaci* (Gennadius), which has been reported for Santiago del Estero, Tucumán, Corrientes, Entre Rios and Buenos Aires provinces, affecting cotton and soybean crops and horticultural crops. Other predominant species is *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) that find mostly in horticultural crops on greenhouse of Santa Fe and Buenos Aires provinces.

The chemical control with insecticides is the method more frequently used for control of “whiteflies”, however, this method presents noxious effects because of this insect pests develops resistance to several insecticides and these products have a further impact on the ecosystem. In the last decades arose an increasing interest in the development of alternative methods, for example the use of entomopathogenic fungi. These fungi are considered to be excellent candidates as biological control agents, because they can infect insects directly through the cuticle, having easy dispersion, persistence in the ecosystem, tolerance to adverse factors for the development of spores of resistance, and manipulation *in vitro* is relatively easy. In Argentina exist several references on the presence and the use of fungal pathogens of pest insects, however, exist few studies referents to the fungi pathogens of the “whitefly”. The overall objective of this thesis was the study of the diversity, pathogenicity and seasonal variation of pathogenic fungi of “whitefly” in horticultural crops of Argentina.

Firstly, was realized a survey and determination of the seasonal variation of the entomopathogenic fungi during two consecutive years (2007-2009), detecting the presence of adults of *T. vaporariorum* infected with *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith during the months of May, June and October of the 2007 in Colonia Urquiza, province of Buenos Aires. Twenty fungal isolates were obtained *in vitro* culture of entomopathogenic fungi from insects infected and samples of soil, the fungi were situated in the Phylum Ascomycota, Class Sordariomycetes, Order Hypocreales, Family Cordycipitaceae, 17 of them were identified as *I. fumosorosea* (Wize) Brown & Smith, 2 as *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, and one as *Lecanicillium* sp. Gams & Zare. The characterization and identification of the species was carried out by description of the morphological characteristics and by molecular techniques. The amplification of two nuclear genes (the elongation factor 1-alfa and the internal

transcribed spacer regions of the ribosomal genes) and the subsequent digestion with restriction enzymes (RFLP-PCR) allowed to confirm the identification of the isolates of *I. fumosorosea* from adults of *T. vaporariorum*.

The pathogenicity was evaluated under laboratory controlled conditions and it was observed that all *I. fumosorosea* isolates caused a cumulative mortality upper to 70% and 80% for nymphs of *T. vaporariorum* and *B. tabaci*, respectively, being the isolate CEP 315 the most pathogenic because it caused a 100% of mortality for both species of “whitefly”. Then, the susceptibility was evaluated for all the states of development of *T. vaporariorum* at the isolate CEP 315, obtaining like result that the adults and the nymphs II and III were the most susceptible states, since they achieved a mortality of 59,7%, 49,7% and 50,3%, respectively, whereas the nymphs I and IV presented an inferior mortality (9,4% and 5,6%, respectively). Besides, the effect of CEP 315 on nymphs of *T. vaporariorum* parasitic with *Eretmocerus* sp. Haldeman (Hymenoptera: Aphelinidae) was determined, observing only a 20% of infection in the parasitic nymphs and a 70% of infection in not parasitic nymphs.

Studies on the interaction of two isolates of *I. fumosorosea* (CEP 304 and CEP 315) with 8 commercial fungicides were assayed, to estimate the compatibility with the phytosanitary products used in the agricultural production. The fungicides Propamocarb 0,15 % and *Trichoderma harzianum* 0,5 % did not showed deleterious effects on the germination of conidia, growth rate and pathogenicity of isolates CEP 304 and CEP 315 of *I. fumosorosea*, therefore, it could be recommended that these isolates would be applied in combination with the fungicides Propamocarb and *T. harzianum* inside the Integrated Pest Management strategy.

Finally, the mass production of the isolates CEP 315 of *I. fumosorosea* and the application of the fungal inoculum in restricted areas with horticultural crops in greenhouse was evaluated. The mass production was carried out in solid substrates corresponding to rice, wheat and wheat bran. The isolate CEP 315 developed white mycelia that covered entirely all the substrates, with the exception of wheat bran. However, the fungal production in rice grains presented a higher production of conidia compared with wheat grains, therefore, rice was the substrate more adequate for the multiplication of *I. fumosorosea* (CEP 315). The suspension of conidia obtained after the production presented a concentration of $5,89 \times 10^8$ spore/ml, a 98,7% of germination and a percentage of infection of 24,4%, 25,3%, 10,5%, 8,8% and 12,5% for the nymphs I, II, III and IV and adults of *T. vaporariorum*, respectively. The application of this

suspension in plantations of tomato and eggplants situated in greenhouses in Los Hornos, La Plata, Buenos Aires province, caused the infection of individuals of “whiteflies” since day fourth post application and continued until 15 days. The maximum number of infected individuals was observed in the day eighth on the eggplant plantations was 3,6% for adults and 12,7% for nymphs, whereas in the plantations of tomato was 9,2% for the adults and 8,2% for the nymphs.

From preliminary results obtained, we can conclude that the isolates of *I. fumosorosea* recovered from natural infections of adults of *T. vaporariorum*, would have potential conditions to be used as agents of biological control of “whitefly” in vegetable crops of economic importance in our country.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCION

El nombre genérico de “mosca blanca” corresponde a un grupo de insectos del orden Hemiptera, suborden Sternorrhyncha, familia Aleyrodidae (Quaintance y Baker, 1913, 1914) que se alimentan succionando la savia de una gran variedad de plantas (hortícolas, frutales y ornamentales) tanto en campo abierto como en invernáculos. Presentan una distribución geográfica mundial, encontrándose principalmente en las zonas templadas y tropicales, como así también, en zonas frías (Blink-Moenen y Mound, 1990; Byrne y Bellows, 1991).

Dentro de las 1200 especies de “mosca blanca” descriptas en el mundo (Mound y Halsey, 1978; Blink-Moenen y Mound 1990), se destacan las especies *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* y *B. argentifolii* porque son consideradas plagas de importancia económica en la producción agrícola (Landa *et al.*, 1994). En nuestro país se registró la presencia de ambas especies (Viscarret y Botto 1996; Botto, 1999), siendo *Bemisia tabaci* una plaga predominante en plantaciones de soja, algodón y cultivos hortícola, mientras que *T. vaporariorum* se registró mayoritariamente en cultivos hortícolas bajo cubierta (Viscarret y Botto 1996; Viscarret, 2000). Además, a partir del año 2000 se registró la transmisión de virus por *B. tabaci* en Bella Vista, Corrientes provocando importantes daños en esos cultivos (Cáceres *et al.*, 2005, a, b).

El método de control de la “mosca blanca” más utilizado en el mundo es la aplicación de insecticidas químicos, sin embargo, este tipo de manejo presenta grandes dificultades, principalmente porque la “mosca blanca” presenta un ciclo de vida corto, gran potencial reproductivo, elevado número de generaciones al año, amplio rango de plantas hospedadoras, ubicación en el envés de la hoja y gran capacidad para desarrollar resistencia a los insecticidas. Además, este método genera un efecto negativo sobre los enemigos naturales de la plaga, riesgos para la salud de productores y consumidores y contaminación ambiental (Ortega Arenas, 1998). Por lo tanto, a nivel mundial se han comenzado a evaluar otros métodos de control tales como el control biológico, el cual consiste en el utilización de enemigos naturales de las plagas (parasitoides, depredadores y microorganismos patógenos) para mantener las poblaciones de las plagas en un nivel tal que no genere un daño importante en las plantaciones (Van Lenteren y Woets, 1998; Berryman, 1999; Eilenberg *et al.*, 2001).

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos que tienen la particularidad de infectar a diferentes grupos de insectos y otros artrópodos, como las

arañas y los ácaros (Boucias y Pendland, 1998). Estos hongos son considerados excelentes candidatos como agentes de control biológico, ya que pueden infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula, presentan dispersión activa o pasiva, persistencia en el medio, tolerancia a factores adversos debido al desarrollo de esporas de resistencia, y su manipulación en cultivos *in vitro* es relativamente fácil (Landa y Osborne, 1992; Murrin, 1996; Hajek, 2005). La mayoría de las infecciones naturales observadas en *B. tabaci* y *T. vaporariorum* son ocasionadas por los hongos del Phylum Ascomycota, Orden Hypocreales, como por ejemplo *Aschersonia aleyrodinis*, *A. andropogonis*, *A. goldiana*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *I. farinosa* y *Lecanicillium lecanii* (Lacey *et al.*, 1993, 1996; Farias y Wraight, 2001; Scorsetti *et al.*, 2008). Además, se registraron infecciones con hongos del Subphylum Entomophthoromycotina, Orden Entomophthorales, como *Conidiobolus* spp, *Entomophthora* spp, *Entomophthora leyteensis* y *Zoophthora radicans* (Lacey *et al.*, 1993, 1996; Farias y Wraight, 2001; Villacarlos *et al.*, 2003). Numerosos estudios están siendo realizados en Europa, Asia y América para evaluar el efecto de los hongos entomopatógenos sobre “mosca blanca” bajo condiciones de laboratorio (Osborne y Landa, 1994; Wraight, 1998; Lacey *et al.*, 1999) y en plantaciones a cielo abierto (campo) o bajo cubierta (invernáculo) (Ravensberg, 1994; Vidal, 1998; Wraight, 2000; Farias y Wraight, 2001, Fargues *et al.*, 2003). Actualmente, existen en el mercado mundial varios micoinsecticidas a base de hongos entomopatógenos para controlar las poblaciones de “mosca blanca”, como por ejemplo Mycotal, Mycotrol WP, y PFR-97 a base de *L. lecanii*, *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, respectivamente.

En la Argentina existen referencias previas sobre la presencia y el uso de hongos patógenos de insectos plaga (Marchionatto, 1934; Yasem de Romero, 1984; López Lastra, 1988, 1989, 1990; Sosa-Gómez y Moscardi, 1991; Sosa-Gómez, 1999; Lecuona, 1999; Toledo *et al.*, 2004, 2008; López Lastra y Scorsetti, 2006, 2007; Scorsetti, 2007, 2008). Sin embargo, las únicas citas sobre los hongos patógenos de “mosca blanca” fueron informadas por Toledo *et al.* (2004), Scorsetti (2007), Scorsetti *et al.* (2008), en donde se registró la ocurrencia natural de infecciones con *L. lecanii*, *L. longisporum*, *L. muscarium*, *I. fumosorosea* e *I. javanica* en individuos de *T. vaporariorum* provenientes de cultivos hortícolas de la provincia de Buenos Aires y de *B. tabaci* Biotipo B infectados con *I. fumosorosea* provenientes de la provincia de Corrientes.

Por lo tanto, en este proyecto de investigación se decidió profundizar en mayor detalle sobre los hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas de

Argentina. En primer lugar, se realizó una prospección y determinación de la variación estacional de los hongos patógenos durante dos años consecutivos de muestreo (2007-2009). Los hongos aislados fueron identificados y caracterizados por métodos morfológicos y por técnicas moleculares, y la patogenicidad de éstos se evaluó bajo condiciones de laboratorio y a campo. Además, se estudio la interacción con fungicidas comerciales con el fin de seleccionar aislamientos fúngicos capaces de controlar las poblaciones de “mosca blanca” y ser compatibles con los productos fitosanitarios utilizados en la producción agrícola.

1. ANTECEDENTES



ANTECEDENTES

1.1. Características de la “mosca blanca”

Con el nombre genérico de “mosca blanca” se conocen comúnmente a los insectos del orden Hemiptera, suborden Sternorrhyncha, familia Aleyrodidae (Quaintance y Baker, 1913, 1914) cuyos adultos tiene un cuerpo cubierto de una fina capa de polvo blanco (“*alearon*” significa harina en latín) producida por dos glándulas epidérmicas localizadas en el abdomen.

La “mosca blanca” es un insecto polífago que se alimenta succionando el floema de una gran variedad de plantas tanto ornamentales, silvestres y cultivadas (Byrne y Bellows, 1991). La distribución geográfica de la “mosca blanca” comprende principalmente las zonas templadas y tropicales (entre los 30° norte y 30° sur de latitud), sin embargo, también puede encontrarse en zonas frías (más de 45° latitud norte) (Blink-Moenen y Mound, 1990; Byrne *et al.*, 1990).

La “mosca blanca” es un insecto hemimetábolo (con metamorfosis incompleta) que tiene los siguientes estados de desarrollo: huevo, ninfa (cuatro estadios) y adulto (figura 1) (Byrne y Bellows, 1991). Los huevos son elípticos de 0,2 mm de largo y de 0,1 mm de ancho, y poseen un pedicelo que los fijan al envés de las hojas. Al principio presentan un corion suave y amarillento que a media que se acerca el momento de la eclosión se oscurece adquiriendo un color marrón. Su distribución puede ser aislada o agrupada (formando círculos o semicírculos), dependiendo de las especies (Byrne y Bellows, 1991; Gill, 1990). Las ninfas se desarrollan en 4 estadios ninfales (I, II, III y IV), las cuales presentan un cuerpo ovalado, aplanado y translúcido con un color blanco-amarillento. La ninfa I emerge del huevo y se desplaza sobre la superficie de la hoja hasta que encuentra un lugar apropiado para alimentarse, en donde fija su aparato bucal y queda inmovilizado por el resto de los estadios inmaduros. El cuerpo de la ninfa I mide 0,3 mm de longitud y 0,15 mm de ancho. El segundo y tercer estadio ninfal son iguales y sólo se diferencian por el aumento de tamaño. El cuerpo de la ninfa II mide 0,4 mm de largo y 0,2 mm de ancho, y el cuerpo de la ninfa III presenta 0,54 mm de largo y 0,3 mm de ancho. El cuarto estadio de la ninfa se subdivide en temprano, medio y tardío según la presencia o ausencia de alimentación y los cambios morfológicos. La ninfa IV recién formada presenta un cuerpo ovalado y aplanado de color translucido pero a medida que avanza su desarrollo se torna opaca y su cuerpo se engrosa. Las

primeras subdivisiones de la ninfa IV se alimentan succionando abundantes cantidades de savia y por lo tanto, secretan grandes cantidades de una sustancia azucarada. La última fase de desarrollo de la ninfa IV, también llamada “pupa”, no se alimenta y presenta un cuerpo de 0,75 mm de longitud y 0,4 mm de ancho. Otra característica fácilmente de observar son los ojos rojos y los pigmentos amarillentos del cuerpo del adulto. La emersión de los adultos ocurre por una apertura dorsal de la “pupa” en forma de T, quedando un “pupario” adherido a la hoja durante cierto tiempo (Mound y Halsey, 1978; Gill, 1990; Byrne y Bellows, 1991). Los adultos miden alrededor de 2 a 3 mm de largo, tienen el cuerpo de color amarillo con tres pares de patas, un par de antenas y dos pares de alas. Generalmente, las alas y parte del cuerpo esta cubierto por un polvo de cera de color blanco, lo que origina el nombre vulgar de “mosca blanca”. Los sexos se diferencian por el tamaño, siendo los machos pequeños y activos, mientras que las hembras son de mayor tamaño y menor movilidad. La copulación tiene lugar después de un cortejo complejo, el cual dura de 2 a 4 minutos. La hembra es capaz de ovipositar entre 100 a 300 huevos en el envés de las hojas superiores de la planta hospedadora. Los huevos provenientes de hembras fecundadas dan origen a ambos sexos, mientras que los huevos de hembras vírgenes producen sólo machos (Byrne y Bellows, 1991).

El tiempo de desarrollo de las “moscas blancas” depende tanto de la temperatura como de la planta hospedadora (Byrne & Bellows, 1991). En términos generales, el ciclo de vida de *Trialeurodes vaporariorum* se completa entre 24 y 28 días (figura 1) cuando se encuentra entre 22° y 25° C en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), melón (*Cucumis melo* L.), poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) y zapallitos (*Cucurbita maxima* Duch) (Burnet, 1949; Woets y Van Lenteren, 1976; Van De Merendonk y Van Lenteren, 1978; Van Sas *et al.*, 1978; Vet *et al.*, 1980; Gerling, 1990; Gerk *et al.*, 1995; López *et al.*, 1999; Cardona *et al.*, 2005). El tiempo de desarrollo de *Bemisia tabaci* varía según la planta hospedadora, siendo de 27 a 38 días en zanahoria (*Daucus carota*), de 16 a 27 días en batata (*Ipomoea batata*) y de 18 a 24 días en berenjena (*Solanum melongena* L.) (Coudriet *et al.*, 1985; Viscarret y Botto, 1997).

Hay especies univoltinas (una sola generación al año) y multivoltinas (más de una generación al año). En ambos casos se ha observado que algunas especies presentan una etapa de hibernación, como ninfas o adultos en cultivos y/o en malezas (Byrne & Bellows, 1991).



Figura 1: Ciclo de vida y duración de los estados de desarrollo de la “mosca blanca” *Trialeurodes vaporariorum*. Fotografía adaptada y modificada de Cardona *et al*, 2005.

1.2. Daños ocasionados por la “mosca blanca”

Todos los estados de desarrollo de la “mosca blanca” (excepto los de huevo y la “pupa”) causan daños en las plantas hospedadoras, los cuales se clasifican en directos e indirectos.

El daño directo se vincula con la succión de grandes cantidades de savia, lo que origina clorosis y dehiscencia temprana de las hojas, y el posterior debilitamiento y marchitamiento de la planta (Berlinger, 1986).

El daño indirecto ocurre por la excreción de sustancias azucaradas por parte de las ninfas y adultos, lo cual favorece la aparición de un complejo de hongos denominado vulgarmente “fumagina”, de aspecto pulverulento oscuro, que disminuyen el área fotosintéticamente activa y afectan la respiración de la hoja. En casos extremos, la “fumagina” puede depositarse también en frutos, perdiendo su calidad comercial (Byrne y Bellows, 1991). El otro daño indirecto, es la transmisión de virosis y bacterias

a las plantas en las que se hospedan. De estas enfermedades, las virosis son las más importantes debido al fuerte impacto en los cultivos. La “mosca blanca” transmite alrededor de siete clases de virus, siendo las más relevantes los geminivirus y los crinivirus (Muniyappa, 1980; Cohen, 1990; Wintermantel, 2004).

1.3. Especies de “mosca blanca” de mayor impacto económico

De las 1.200 especies de “mosca blanca” descritas en el mundo (Mound y Halsey 1978; Bink-Moenen y Mound, 1990), sólo unas pocas están registradas como plagas de importancia económica en cultivos. A continuación se detallan las especies de “mosca blanca” más importantes desde el punto de vista económico y las plantas hospedadoras más afectadas por éstas:

- *Aleurocybotus indicus* (David y Subramaniam) en arroz.
- *Bemisia tabaci* (Gennadius) en plantas de la familia Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Malvaceae y Solanaceae.
- *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en la familia de Brassicaceae, Fabaceae, Malvaceae y Solanaceae.
- *Bemisia argentifolii* (Bellows y Perring) en poinsettias.
- *Trialeurodes abutiloneus* (Haldeman) en algodón.
- *Aleyrodes spiraeoides* (Quaintance) en papa.
- *Aleurocanthus spiniferus* (Quaintance) en cítricos.
- *Aleurothrixus floccosus* (Maskell) en cítricos y café.
- *Aleurodicus dispersus* (Russell) en coco.
- *Siphoninus phillyreae* (Haliday) en peras y manzanas.

A partir de los años '90, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Bemisia argentifolii* (Bellows y Perring) fueron consideradas “superplagas” por su gran impacto en la producción agrícola de los Estados Unidos y algunos países del Caribe y Medio Oriente (Byrne *et al.*, 1990; Perring *et al.* 1993 a, b).

Trialeurodes vaporariorum, o "mosca blanca de los invernaderos" (Greenhouse Whitefly), afecta más de 250 especies de plantas hospederas. En ambientes protegidos puede llegar a ser una plaga de importancia, atacando entre otros cultivos plantas ornamentales y hortalizas (Mound y Halsey, 1978; Russell, 1977; Hussey y Scopes,

1985; Vet *et al.*, 1980). Originariamente fue descrita como *Aleyrodes vaporariorum* por Westwood en 1856 al encontrarla sobre *Solanum* spp. (Solanaceae); *Gonolobus* sp. (Asclepiadaceae); *Tecoma velutina* Lindl. (Bignoniaceae); *Bignonia* spp. (Bignoniaceae) y *Aphelandra* spp. (Acanthaceae) en Inglaterra. Russel (1977) consideró a *T. vaporariorum* originaria del sudoeste de Estados Unidos, registrándola también en América del Sur (Perú, Colombia, Ecuador, Guyana, Brasil, Chile y Argentina).

Bemisia tabaci, o “mosca blanca de la batata” (Sweetpotato Whitefly), afecta a más de 300 especies de plantas hospederas (Byrne *et al.*, 1990) y se caracteriza por ser el principal vector de los geminivirus, los cuales son los más importantes debido a su gran impacto económico (Bedford *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Polston y Anderson, 1997). Originalmente fue descrita por Gennadius en 1889 como *Aleyrodes tabaci* encontrándola sobre plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en Grecia. El primer espécimen registrado en América fue en Estados Unidos sobre *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) y descrito por Quaintance (1900) como *Aleyrodes inconspicua*. En América del Sur, las primeras citas sobre *B. tabaci* son de Brasil en el año 1957 (Bondar, 1928), y a partir de los años '80 se registró como el vector más importante de virosis afectando cultivos en Costa Rica, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Cuba, Panamá, Jamaica, Puerto Rico, México (Hilje, 2002) y Argentina (Viscarret y Botto, 1996). En el año 2004 la Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal (EPPO) informó que *B. tabaci* se encuentra localizada en todos los continentes a excepción de la Antártida, y que ésta distribución mundial puede deberse al transporte de productos vegetales infestados con este insecto.

Bemisia argentifolli, o “mosca blanca de la hoja plateada” (Silverleaf Whitefly), es considerada la principal plaga en plantaciones de poinsettias en todo el mundo (Bellows *et al.*, 1994). Originariamente fue denominada *B. tabaci* biotipo B al ser registrada en plantaciones de ornamentales cultivadas en invernadero en Estados Unidos. En 1991, *B. argentifolli* se extendió por el sur de América del Norte (Florida, Texas, Arizona, California, Georgia, Louisiana) y México causando pérdidas de más de US\$ 500 millones por año en la agricultura (Perring *et al.* 1993 a, b). Actualmente, se ha establecido tanto en cultivos a campo como en invernáculo (Bedford *et al.*, 1994; Brown, 1994) y se encuentra localizada en América del Norte, América Central y en Perú, Colombia, Ecuador, Brasil y Paraguay (Costa *et al.*, 1993; Bellows *et al.*, 1994; López-Avila *et al.*, 2001).

1.4. Métodos de control para la “mosca blanca”

Existen varios métodos para controlar las poblaciones de “mosca blanca”, los cuales se detallan a continuación:

1.4.1. El control químico: se han usado insecticidas pertenecientes a diferentes grupos químicos: los nicotinoides que incluyen a Imidacloprid (Confidor), Acetamiprid (Mospilan), Tiametoxam (Actara); los piretroides como el producto comercial Karate; los piridazinonas que tiene un único miembro denominado Piridaben (Sanmite); los organoclorados como el Endosulfan (Thiodan); los reguladores del crecimiento de los insectos como el Buprofezin (Applaud); y los insecticidas vegetales como las formulaciones de Neem y de aceite blanco (Rocio Blanco, Rociol, Actellic + Etiaceite). Para controlar las poblaciones de *T. vaporariorum*, los principios activos Imidacloprid y Buprofezin presentaron los mejores valores de mortalidad de la plaga en los estados de desarrollo de huevo y ninfas; sin embargo, la eficacia del primer producto fue más elevada. En las poblaciones de *B. tabaci*, el control del estado de huevo y ninfas sólo fue efectivo con Imidacloprid, siendo muy bajo el efecto sobre la “pupa”. Por otra parte, el uso continuo de insecticidas químicos ocasionó la aparición de individuos de “mosca blanca” resistentes, ya que el proceso de selección es rápido por desarrollarse varias generaciones durante un solo ciclo de cultivo (Dittrich *et al.*, 1990). Además, debido a que los estados inmaduros de éstos insectos se desarrollan en el envés de las hojas, la acción de los insecticidas no es tan efectiva y, por lo tanto, se tienen que realizar más aplicaciones. En la actualidad ya hay evidencias de resistencia para todos los productos citados, en varios sistemas agrícolas de Europa, Norteamérica e Israel (Palumbo *et al.* 2001). En el año 2005 se realizaron varios estudios en el Centro Internacional de la Agricultura Tropical de Colombia en donde se demostró que la “mosca blanca” generó resistencia a los insecticidas organofosforados, como metamidofós (Tameron, Monitor), Malathion, carbosulfan (Elthra) y a los piretroides como Cipermetrina (Cymbush).

1.4.2. El control cultural: busca favorecer el crecimiento y desarrollo del cultivo en detrimento de las plagas. Ejemplos de esto son: los cultivos trampa, los cambios en la fecha de transplante, las trampas atrayentes de insectos, la densidad de plantación, la rotación y secuencia de cultivos, el aumento de la diversidad vegetal, la

colocación de mallas para evitar la entrada de los insectos plagas al invernáculo, etc. Cabe aclarar que este tipo de método funciona de manera preventiva, por lo que en casos de densidades elevadas de la “mosca blanca” se debe recurrir a otro método de control.

1.4.3. El control biológico: consiste en el uso de enemigos naturales para regular la densidad poblacional de otro organismo considerado plaga (Van Lenteren y Woets, 1998; Berryman, 1999; Eilenberg *et al.*, 2001). Esta forma de control está basada en el conocimiento de las interacciones ecológicas a nivel del agro-ecosistema (De Bach y Rosen, 1991). Como enemigos naturales se destacan los depredadores, parasitoides y los entomopatógenos (De Bach y Rosen, 1991; Van Lenteren, 2000a; Koul y Dhaliwal, 2003; Van Lenteren y Bueno, 2003; Samson *et al.*, 1988; Osborne y Landa, 1992).

La mayoría de los depredadores de la “mosca blanca” son pequeños artrópodos, polífagos, que se alimentan preferentemente de los huevos y ninfas (Gerling, 1990). Entre los depredadores se encuentran algunos ácaros pertenecientes a la familia Phytoseiidae (*Amblyseius spp.*, *Euseius spp.*, y *Typhlodromus spp.*) (Teich, 1966; Osman, 1971). Dentro de los insectos, varios órdenes contienen depredadores de la “mosca blanca”. La familia de los Coccinélidos incluye los más importantes como *Clitostethus arcuatus* (Rossi), aunque generalmente no son capaces por sí solos de mantener las poblaciones de “moscas blancas” por debajo del nivel de plaga (Agekyan, 1977; Gold *et al.*, 1989; Bellows *et al.*, 1992; Heinz *et al.*, 1994; Hoelmer *et al.*, 1994). Algunos heterópteros de la familia Anthocoridae (*Orius laevigatus*, *O. majusculus*, *O. niger*, *O. sauteri*), Miridae (*Macrolophus caliginosus*, *Dicyphus tamaninii*, *Dicyphus hesperus*, *Cyrtopeltis tenuis*, *Cyrtopeltis varians*), y Reduviidae tienen una importante actividad depredadora, sobre todo en “moscas blancas” de cultivos hortícolas, citándose también sobre alguna especie de “mosca blanca” de cítricos (Gold y Altieri, 1989; Kapadia y Puri, 1991). Los neurópteros de la familia Chrysopidae (*Chrysoperla carnea*, *Chrysopa exterior*) se alimentan, entre otras presas, de huevos y ninfas de “moscas blancas” (Kapadia y Puri, 1990). Ocasionalmente algunas especies de dípteros, como *Achetoxenus formosus*, pueden depredar “moscas blancas”, aunque con poca eficacia en el control. Entre los tisanópteros, la familia de los flaeotrípidos (*Dialeurodes citri*) fue citada en la bibliografía alimentándose de la mosca de los cítricos, *Aleurothrix floccosus* (Morrill y Back, 1912).

Los parasitoides más utilizados para controlar las poblaciones de “mosca blanca” corresponden al orden Hymenoptera, familias Aphelinidae, Eulophidae y Platygasteridae (Gerling, 1990, 1992). Dentro de la familia Aphelinidae se encuentran los géneros *Encarsia* Foerster y *Eretmocerus* Haldeman, a los que pertenecen la mayoría de los parasitoides de la “mosca blanca” (Mound y Halsey, 1978; López-Avila, 1986). El género *Encarsia* contiene unas 200 a 250 especies descritas. Es un género de distribución mundial, donde las hembras son parasitoides primarios de ninfas de “moscas blancas”. Los machos pueden ser hiperparasitoides de hembras de su propia o de otra especie de afelínido, desarrollarse como parasitoides primarios de huevos de Lepidoptera, o bien desarrollarse, al igual que las hembras, como parasitoides primarios de aleiródidos (Polaszek *et al.*, 1992; Williams y Polaszek, 1996). Dentro del género *Eretmocerus* todas las especies conocidas comprenden parasitoides primarios de “moscas blancas” (Gerling, 1990; Williams y Polaszek, 1996).

El control de plagas utilizando entomopatógenos (bacterias, hongos, virus, protozoos y nematodos) es conocido como control microbiano (Alves, 2008). El control de la “mosca blanca” con microorganismos patógenos recibió especial interés en los últimos años, enfatizando el estudio en los hongos entomopatógenos, por ser los agentes infecciosos predominantes y por desarrollar epizootias en gran parte del mundo (McCoy *et al.*, 1988; Osborne y Landa, 1992; Roberts y Hajek, 1992; Charnley, 1997; Wraight *et al.*, 2000; Shah y Pell, 2003; Hajek, 2005).

El control biológico de la “mosca blanca” es ampliamente aplicado en varios países, como por ejemplo Estados Unidos, México, Brasil, España, Holanda, Italia, Francia y China (Gerling, 1992; Van Lenteren y Woets, 1998; Van Lenteren, 2000; Van Lenteren y Martín, 2001; Van Lenteren y Bueno, 2003; Van Driesche *et al.*, 2007).

1.4.4. Manejo integrado de las plagas: 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 a las plagas por debajo de los niveles poblacionales que produzcan daño económico al cultivo (Kogan, 1998; Pérez Moreno, 2000; Romero, 2004). Varios estudios están siendo realizados mundialmente para establecer los métodos de control más adecuados para la “mosca blanca” y así diseñar protocolos que contemplen el uso racional de productos fitosanitarios, la rotación de los cultivos, la presencia de enemigos naturales y las prácticas culturales correctas (Fuxa 1987; Ortega Arenas, 1998; Polack, 2005).

1.5. Hongos entomopatógenos: características biológicas.

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos que tienen la particularidad de parasitar a diferentes grupos de insectos y otros artrópodos, como las arañas y los ácaros (Boucias y Pendland, 1998). Dentro del grupo de los insectos, los hongos entomopatógenos infectan mayoritariamente los órdenes Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera, donde la infección ocurre frecuentemente en los estados inmaduros (larvas o ninfas) y en los adultos (Tanada y Kaya, 1993).

Los hongos entomopatógenos han sido ampliamente estudiados en todo el mundo, habiéndose encontrado más de 750 especies reunidas en 100 géneros diferentes (Lecuona, 1996; Vega y Blackwell, 2005). Los principales grupos de hongos patógenos de insectos se encuentran en Reino Mycota y se ubican en el Phylum Ascomycota y Subphylum Entomophthoromycotina (Murrin, 1996; Hajek y Delalibera, 2010).

Los hongos del Phylum Ascomycota, se caracterizan por presentar hifas septadas que se diferencian en conidióforos, células conidiógenas o fiálides y conidios los cuales corresponden a las estructuras reproductivas asexuales. La producción de los conidios ocurre en las células conidiógenas erectas del micelio aéreo y la dispersión de éstos es de manera pasiva. Estos hongos, se encuentran en la naturaleza mayoritariamente en su estado asexual o conidial (anamorfo) más que en su estado sexual (teleomorfo). Por eso, antiguamente eran clasificados como “Imperfectos” y se encontraban dentro del subphylum “Deuteromycota”. Actualmente, los hongos entomopatógenos más importantes del Phylum Ascomycota, se ubican en Subphylum Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales subdividido en tres familias. En la Familia Clavicipitaceae se encuentran los géneros *Aschersonia*, *Hypocrella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*; en la Familia Cordycipitaceae se hallan *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, y en la Familia Ophiocordycipitaceae, se encuentran los géneros *Ophiocordyces*, *Hirsutella*, *Tolyposcladium*, *Hasposporium* (Samson *et al.*, 1988; Humber, 1997; Hodge, 2003; Sung *et al.*, 2007; Sosa-Gómez *et al.*, 2010).

Dentro del Subphylum Entomophthoromycotina, Orden Entomophthorales, se incluyen más de 200 especies patógenas, las cuales generan epizootias en hemípteros, lepidópteros, ortópteros y dípteros. Los hongos de este orden se caracterizan por presentar hifas no septadas y son de reproducción asexual y sexual. La reproducción sexual ocurre por la formación de conidios primarios, los cuales germinan y penetran en

el insecto, pudiendo originar conidios secundarios y terciarios. Dentro del insecto producen cuerpos hifales y, si las condiciones no son favorables, forman esporas de resistencia. Además, tienen la característica de emitir rizoides que fijan el insecto al sustrato vegetal. Las principales especies de Entomophthorales son: *Conidiobolus*, *Zoophthora*, *Pandora*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Neozygites* (Papierok y Hajek, 1997; Humber, 1997; Benny *et al.*, 2001; Hibbett *et al.*, 2007; Sosa-Gómez *et al.*, 2010).

En general los hongos del Phylum Ascomycota son considerados como patógenos facultativos, infectando un amplio rango de órdenes de insectos. La muerte del hospedador está asociada comúnmente a la producción de toxinas, a diferencia de los hongos del Subphylum Entomophthoromycotina, en los que la muerte del insecto hospedador ocurre debido a la colonización de tejidos (Humber, 1984).

Aún cuando las condiciones ambientales sean las apropiadas, la patogenicidad del hongo dependerá del insecto hospedador. La defensa de los insectos contra las infecciones fúngicas puede estar dada a nivel cuticular, inmunológico o de comportamiento, el rango de especificidad puede variar desde una especie hasta una amplia diversidad de especies hospedadoras (Boucias y Pendland, 1998).

1.6. Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos

El ciclo de infección de los hongos entomopatógenos y el consecuente desarrollo de una micosis, ocurre en una serie de pasos que se detallan a continuación y se representan en la figura 2.

1.6.1. Adhesión de los propágulos infectivos a la cutícula del insecto

El paso inicial en la infección de los insectos por los hongos patógenos involucra la adhesión de los propágulos infectivos (conidios o esporas) a la cutícula del insecto, lo cual ocurre por las propiedades físicas, químicas y electrostáticas de la superficie del conidio y de la cutícula. Algunas especies de hongos presentan glicoproteínas (como las lectinas), mucopolisacáridos o enzimas (esterasas y lipasas) que favorecen la adhesión de las esporas a sitios específicos de la cutícula (Tanada y Kaya, 1993; Lecuona, 1996; Boucias y Pendland, 1998).

1.6.2. Germinación de los propágulos infectivos

Luego de la adhesión e hidratación de los conidios, ocurre la germinación de los conidios que origina un tubo germinativo y, en algunos casos, la formación de un apresorio. La germinación depende en gran parte de la humedad ambiental y temperatura, y en menor grado, de las condiciones de luz y nutrición (Tanada y Kaya, 1993). La formación de un apresorio está relacionado con la capacidad de penetrar la cutícula de los insectos, debido a la presión mecánica o a una actividad enzimática en el ápice del mismo (Murrin, 1996). La presencia del apresorio se demostró *in vitro* e *in vivo* en diferentes hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa* y *Metarhizium anisopliae* (Lecuona, 1996). El resultado de la germinación y la penetración no depende necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, el modo de germinación, la agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedero (Samson *et al.*, 1988).

1.6.3. Penetración del tegumento

El modo de penetración principalmente depende de las propiedades de la cutícula, el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales del tegumento del insecto (Charnley, 1984). En la penetración participan dos mecanismos: uno físico y otro enzimático. El primero consiste en la presión mecánica ejercida por el extremo de la hifa invasiva o por el apresorio, que origina el quiebre de las áreas esclerotizadas y membranosas y la consecuente deformación de la cutícula (Tanada y Kaya, 1993). El mecanismo enzimático consiste en la acción de proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan la cutícula en la zona de penetración y facilita la penetración del tubo germinativo o hifa invasiva. Estudios *in vitro* demostraron que la digestión del tegumento del insecto es llevada a cabo por esterasas y proteasas en las primeras 24hs de la infección, seguido de la actividad de quitinasas y quitinobiasas en el tercer día, y finalmente, la acción de las lipasas a partir del 5 día (Tanada y Kaya, 1993; St. Leger, 1986). Sin embargo, la secreción de enzimas durante los primeros estadios de desarrollo del hongo no es siempre condición suficiente para asegurar la penetración del tegumento (Lecuona, 1996).

1.6.4. Multiplicación del hongo en el hemocele y muerte del insecto

Una vez en el interior del insecto, la mayoría de los hongos entomopatógenos convierten el crecimiento miceliar en un crecimiento por gemación, dando formas

miceliales unicelulares llamadas blastosporas (en Ascomycota), cuerpos hifales (en Entomophthorales) o protoplastos, que se multiplican y se dispersan rápidamente por el interior del insecto (Samson *et al.* 1988; Murrin, 1996; Boucias y Pendland, 1998). Estas estructuras fúngicas evitan la defensa inmune del insecto ya que no son reconocidas por la población de hemocitos del insecto (Tanada y Kaya, 1993).

Previo a la muerte del insecto, la multiplicación del hongo en el interior del insecto origina cambios fisiológicos que se observan como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados (Lecuona, 1996).

La muerte del insecto puede ocasionarse por la secreción de sustancias tóxicas denominadas micotoxinas (en Ascomycotas) o por la depleción de los nutrientes de la hemolinfa y la invasión completa de los tejidos del insecto (en Entomophthorales) (Tanada y Kaya, 1993; Murrin, 1996; Boucias y Pendland, 1998). El tiempo que demanda la muerte del insecto dependerá del hongo entomopatógeno, del insecto hospedador y de los factores ambientales (Lecuona, 1996).

1.6.5. Emersión del hongo y dispersión de los propágulos infectivos

Después de la muerte del insecto, si las condiciones ambientales no son favorables, el hongo permanece en el interior del insecto y el tegumento se mantiene intacto. Sin embargo, si las condiciones de humedad relativa son altas, las estructuras fúngicas logran atravesar nuevamente el tegumento para emerger hacia el exterior del insecto. Generalmente, la emersión del hongo ocurre por regiones menos esclerosadas de la cutícula, como las membranas intersegmentales o los espiráculos (Lecuona, 1996).

Si las condiciones de humedad relativa son altas, las hifas presentes en el exterior del insecto producen esporas dentro de las 24 a 48 horas. El insecto pasa ahora a tomar una coloración característica para cada especie de hongo, como por ejemplo, blanca en *Beauveria*, verde claro en *Nomuraea*, blanca amarillenta o rosa en *Isaria*.

Los propágulos infectivos (esporas o conidios) producidos en el exterior del cadáver son dispersados por el viento, agua o animales, y cuando éstos tiene contacto con otro insecto comienza nuevamente el ciclo de infección (Boucias y Pendland, 1998). La dispersión de las esporas o conidios depende de las características de la espora y del esporangio, siendo un proceso activo en los hongos Entomophthorales o pasivo en los hongos Ascomycota (Tanada y Kaya, 1993; Shah y Pell, 2003).

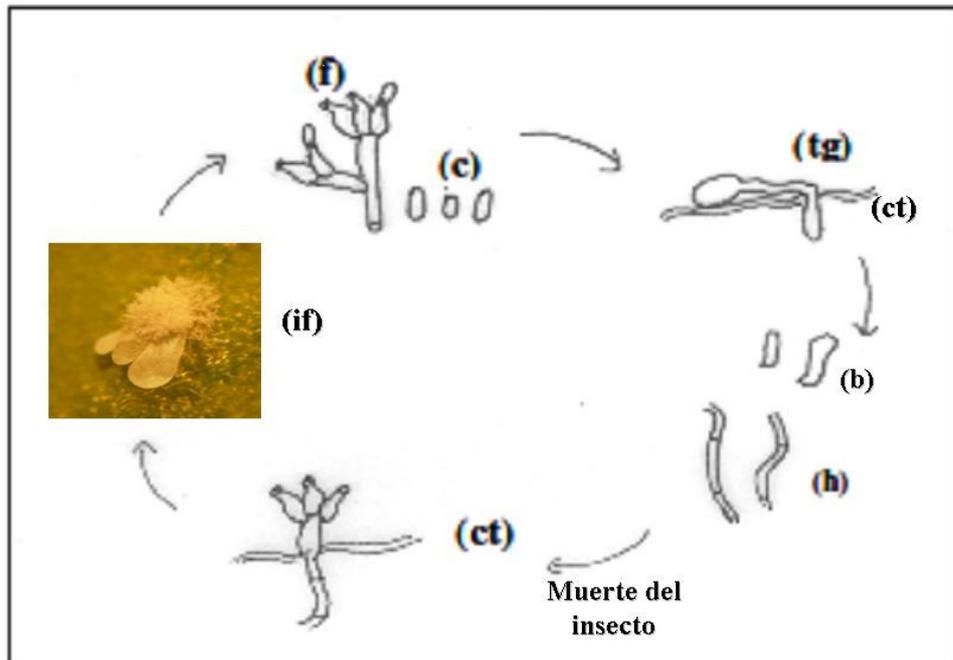


Figura 2: Esquema del ciclo de infección de los hongos entomopatógenos (Ascomycota:Hypocrales).

f: fiálides; **c:** conidios; **tg:** tubo germinativo; **ct:** cutícula del hospedador; **b:** blastosporas o protoplastos; **h:** hifas; **if:** insecto infectado. Esquema adaptado y modificado de Scorsetti (2007).

1.7. Caracterización e identificación de los hongos entomopatógenos

La caracterización de los hongos entomopatógenos, tanto a nivel morfológico, fisiológico y molecular, es considerada una etapa primordial para la selección de especies fúngicas como agentes de control biológico de insectos (Sosa-Gómez y Alves, 1983, 1984; Tigano-Milani *et al.*, 1995 a, b; Boucias *et al.*, 2000).

La caracterización morfológica consiste en el estudio de las estructuras macroscópicas (el aspecto y color de las colonias y la velocidad de crecimiento en medios artificiales) y microscópicas (la forma y tamaño de las hifas, conidióforos, fiálides y conidios). Especialmente, la forma y tamaño de los conidios son utilizados para la identificación de las especies de *Isaria*, *Beauveria* y *Metarhizium* (Tzean *et al.*, 1997, Humber, 1997, 2005; Samson *et al.*, 1988). Esta forma de caracterización permite identificar las especies de hongos entomopatógenos y en algunos casos, seleccionar cepas o variedades que se diferencian entre sí en algunos caracteres morfológicos, tales como, la velocidad de crecimiento, el porcentaje de germinación y la virulencia,

(Tanada y Kaya, 1993). Sin embargo, debido al carácter pleomórfico de algunas especies es común observar variaciones morfológicas de las células conidiogénas y sus conidios y, por lo tanto, su caracterización e identificación se torna imprecisa.

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).

Las isoenzimas se generan cuando una mutación en un gen estructural se traduce en una modificación de un aminoácido y pueden ser reveladas en la medida que la proteína mutante difiera de la original en cuanto a su carga, conformación o punto isoeléctrico. El análisis isoenzimático ha permitido caracterizar la variabilidad genética intraespecífica en *Nomuraea rileyi* (Joslyn y Boucias, 1980), *Hirsutela thompsonii* (Boucias et al., 1982), *Conidiobolus obscurus* (Lalgé y Boucias, 1984) y *Beauveria bassiana* (Poprawsky et al., 1988; St. Leger et al., 1992).

Por otra parte, se han desarrollado una amplia gama de técnicas moleculares que permiten el análisis de los ácidos nucleicos. Entre ellas se destaca la “reacción en cadena de la polimerasa” (the Polymerase Chain Reaction, PCR), la cual consiste en la amplificación de secuencias de ADN en presencia de “cebadores” (primers), ADN polimerasas y los 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).

La caracterización de los hongos entomopatógenos es llevada a cabo por dos tipos de métodos basados en la PCR: los métodos inespecíficos y los métodos específicos (Meyling, 2008). Dentro de los primeros, se encuentra la técnica RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), la cual consiste en la amplificación al azar de regiones de ADN mediante la utilización de primers cortos e inespecíficos. Esta técnica fue ampliamente utilizada para estudiar la variabilidad genética inter-específica e intra-específica de *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* y *Beauveria bassiana* (Williamns et al., 1990; Tigano-Milani et al., 1995 a, b; Cantone y Vandenberg, 1998; Bidochka et al., 1994; Obornik et al., 1999; Becerra et al., 2007). Los métodos de PCR específicos son: PCR-RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”), que consiste en la amplificación de regiones específicas de ADN y la digestión de éstas con

enzimas de restricción; y el método de ISSR (“Inter-Simple-Sequence-Repeats”) que se desarrolla a partir de la amplificación de Secuencias Simples Repetitivas (SSR) del genoma, formadas por una secuencia de 6 nucleótidos repetida varias veces en *tandem* (también denominados “microsatélites”). Ambas técnicas generan un perfil de múltiples bandas de ADN, el cual es comparado para determinar la variabilidad genética (Meyer, 1991; Zietkiewicz *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 2002; Jensen y Eilenberg, 2001; Wang *et al.*, 2005).

Además, la amplificación de genes específicos por PCR y el secuenciamiento de éstos permite estudiar las relaciones filogenéticas entre varios taxones y dentro de los taxones. La amplificación de ADN ribosomal (ADNr), fue una de las primeras aplicaciones de la PCR en la micología (White *et al.*, 1990). Las secuencias de ADNr 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: ADNr 18S, ADNr 5,8S y ADNr 28S, los cuales son separados por dos regiones denominadas “espaciadores transcritos internos” (en inglés, “ITS”). Debido a que los genes 18S y 28S presentan regiones altamente conservadas, 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- α), el cual permitió estudiar la variabilidad entre diferentes aislamientos de *Beauveria* (Glare, 2004; Rehner y Buckley, 2005).

En el campo de la taxonomía resulta importante comparar los resultados obtenidos por la caracterización morfológica y por las técnicas moleculares, para generar una mayor precisión en la identificación de los aislamientos fúngicos y analizar su variabilidad genética entre las poblaciones de los hongos entomopatógenos.

1.8. Los hongos entomopatógenos como agentes potenciales del control biológico

Las infecciones naturales causadas por los hongos entomopatógenos juegan un rol preponderante en el control de muchas plagas. Ocasionalmente, la mortalidad alcanza niveles elevados causando epizootias y provocando una notable disminución en las poblaciones de las plagas. Sin embargo, en ocasiones puede ser necesario incrementar su incidencia en forma artificial mediante la inoculación de los hongos entomopatógenos para aumentar su efecto insecticida. Por lo tanto, dentro del control biológico se plantea como una alternativa la introducción inoculativa o inundativa de éstos hongos en forma de productos comerciales o artesanales.

Además, en los últimos años aumentó la exigencia de productos alimenticios de mejor calidad, ocasionando un crecimiento de la agricultura orgánica, que se basa en el uso de productos naturales de bajo impacto ambiental. En función de esto, se generó un gran interés en la utilización de los hongos entomopatógenos en el control biológico de plagas y, por lo tanto, surgieron pequeñas industrias, laboratorio e instituciones que focalizaron sus investigaciones en la búsqueda y selección de aislamientos fúngicos con elevada producción de conidios y virulencia, como así también, en los métodos de producción a gran escala, la formulación y la aplicación en cultivos de importancia económica (Ignoffo 1981; Ferron, 1985; Landa *et al*, 1994; Jenkins *et al.*, 1998).

Hasta al momento, se han utilizados alrededor de 20 especies de hongos entomopatógenos en el control biológico clásico (Hajek y Delalibera, 2010). Las especies del Phylum Ascomycota, orden Hypocreales, son las más utilizados, ya que tienen un amplio rango de insectos hospedadores y su manipulación en cultivos *in vitro* y en fermentaciones sólidas es relativamente fácil (Murrin, 1996). Los hongos del Subphylum Entomophthoromycotina, Orden Entomophthorales, son buenos candidatos para el control biológico debido a su estricta especificidad, a su capacidad de generar epizootias y al desarrollo de esporas de resistencia, sin embargo, su crecimiento es reducido en cultivos *in vitro* y no pueden ser producidos a gran escala (Pell *et al.*, 2001; Papierok, 2007).

Unos pocos programas de control biológico están siendo empleados para controlar las poblaciones de insectos del Orden Hemiptera, Coleoptera y Lepidoptera mediante la introducción de hongos entomopatógenos. Estos programas se están desarrollando mayoritariamente en áreas de América del Norte y las islas del Pacífico y en menor medida en América Latina (Hajek y Delalibera, 2010).

1.9. Desarrollo de micoinsecticidas a base de hongos entomopatógenos

La producción masiva de hongos entomopatógenos tiene como objetivo la multiplicación a gran escala de las estructuras fúngicas, como micelio, conidios o blastosporas, para luego ser empleadas en la formulación de micoinsecticidas.

El punto de partida para la producción de un micoinsecticida es contar con una cepa que reúna las siguientes condiciones: abundante producción de conidios, elevada virulencia, ser fácilmente cultivable, no ser toxica para el hombre y ningún animal de sangre caliente y ser económicamente rentable (Goettel, 1984). Además, se debe tener en cuenta su crecimiento, esporulación, estabilidad genética y capacidad de supervivencia y persistencia en el medio ambiente (Jaronsky, 1986).

La producción masiva puede clasificarse según el método de multiplicación en: producción *in vitro* o producción *in vivo*. La producción *in vitro* es el método mayormente utilizado en la multiplicación de los hongos con requerimientos nutricionales menos exigentes, como por ejemplo los hongos del orden Hypocreales (Goettel y Roberts, 1991). En cambio, la producción *in vivo* es llevada a cabo con patógenos obligados que tienen requerimientos nutricionales complejos y, por lo tanto, la única alternativa para propagarlos es a través de pasajes por insectos susceptibles a éstos (Ignoffo, 1981).

La producción *in vitro* puede llevarse a cabo en sustratos sólidos, líquidos o en sistemas bifásicos. La fermentación en sustratos sólidos es la alternativa más utilizada para el crecimiento y producción de conidios de los hongos entomopatógenos a escala industrial. Los sustratos sólidos generalmente son granos de plantas gramíneas, como por ejemplo arroz, cebada y trigo, los cuales pueden ser colocados en botellas de vidrio, bolsas de polipropileno o bandejas metálicas (Alves, 1986, 1998). Al inicio de las investigaciones sobre la fermentación en sustratos sólidos, se utilizaban botellas de vidrio para la multiplicación de las estructuras fúngicas, pero este sistema de producción fue progresivamente descartado por los costos elevados de las botellas, su fragilidad y las dificultades para su reutilización. Se plantearon dos procedimientos de fermentación sólida que introdujeron mejoras en la economía del proceso: uno de ellos es llevado a cabo en bolsas de polipropileno autoclavables (Aquino *et al.*, 1977) y el otro mediante la utilización de bandejas (Alves y Pereira, 1989). Existen varias empresas brasileras que utilizan estos procedimientos de producción masiva de hongos entomopatógenos, como por ejemplo la empresa brasilerá Biomax que comienza la producción de micelio

en bolsas de plástico conteniendo granos de arroz y luego finaliza la producción en bandejas ubicadas dentro de un cuarto en condiciones asépticas (Alves y López, 2008).

Otra manera de producción *in vitro* es llevada a cabo en cultivo líquidos, la cual permite realizar un estricto control de las condiciones fisicoquímicas. Sin embargo, la mayoría de los hongos del orden Hypocreales no producen conidios en cultivos líquidos a pesar de crecer un rendimiento abundante de blastosporas (Roberts y Sweeney, 1982). Estas blastosporas son fragmentos de micelio de pared delgada y aspecto levaduriforme, las cuales resultan infectas pero tienen un tiempo de vida medio corto y no soportan condiciones ambientales extremas como los conidios (Roberts y Sweeney, 1982).

La producción *in vitro* en sistemas bifásicos, aprovecha las ventajas de la producción en medios sólidos y como así también la fermentación en medio líquido. Esta producción consta de dos etapas: la primera de multiplicación en medios líquidos para obtener abundante micelio, seguida de una segunda etapa en donde el micelio es distribuido en bandejas, las que son alojadas en un cuarto con temperatura y humedad controlada hasta alcanzar la esporulación.

Una vez obtenidos los conidios por producción masiva, el subsiguiente paso es la formulación, la cual consiste en mezclar el ingrediente activo, es decir los conidios, con materiales inertes (agentes emulsionantes, humectantes, protectores de luz UV, etc.) que protejan al hongo y faciliten el almacenamiento (Monzón, 2001). Existen dos tipos de formulaciones: seca o líquida. Las formulaciones secas o como polvo mojable se utiliza un vehículo de origen mineral o vegetal, que ayuda a absorber la humedad de los conidios y mantiene la viabilidad de éstos por un tiempo considerable. Estas formulaciones no cuentan con gran aceptación del mercado, ya que traen serios problemas de aplicación y ocasionan alergia al usuario (Lecuona, 1996). Las formulaciones líquidas utilizan un líquido emulsionante que tiene la función de mantener suspendidos los conidios en una mezcla homogénea y que garantice una adecuada aplicación mediante mochilas pulverizadoras (Monzón 2001).

Previo a la comercialización de los micoinsecticidas se requiere un control de las propiedades biológicas, físicas y químicas de los formulados. Para esto se realizan pruebas microbiológicas que establezcan la concentración de conidios, la germinación de las esporas y la pureza del formulado. Además, se determina el pH, el porcentaje de humedad y el tamaño de las partículas que aseguren al usuario un producto con la máxima eficacia de control en el campo (Vélez *et al.* 1997).

Las formulaciones comercializadas a base de hongos entomopatógenos están siendo elaboradas con conidios, blastosporas o micelio, los cuales fueron mezclados con diferentes materiales, tales como el aceite vegetal, medios de cultivos, agua y estabilizantes. En América Latina, la formulación de conidios en granos de arroz precocidos fue ampliamente desarrollada en industrias privadas y nacionales, sin embargo, la comercialización de estos formulados presentó varias complicaciones a la hora de la preparación de la suspensión de conidios, el almacenamiento de las bolsas de arroz y en la aplicación en el campo. Dentro de las formulaciones más avanzadas en América Latina se encuentra el aceite emulsionante que puede ser tratada como una suspensión concentrada de conidios y es estable en el medio ambiente, ya que protege a los conidios de la desecación y de la radiación solar (Alves y López, 2008).

Actualmente, en el mercado mundial existen varios micoinsecticidas a base de hongos entomopatógenos para controlar las plagas de importancia económica (Charnley, 1997). En América Latina la mayor cantidad de micoinsecticidas está siendo elaborada por Brasil seguido por Colombia, México, Cuba, Venezuela y Costa Rica (Alves y López, 2008). Algunos ejemplos de insecticidas a base de *B. bassiana* son Mycotrol, Naturalis-L, Betel, Ostrinil, Boverin, Boverol y Boverosil, los cuales son producidos en Estados Unidos, Alemania, Francia, Rusia, República Checa, China. Los nombres comerciales para las formulaciones a base de *M. anisopliae* son BIO 1020, Biogreen, Metaquino, Bio-Path y son elaborados en Alemania, Australia, Brasil y Estados Unidos. Los insecticidas a base de *L. lecanii* e *I. fumosorosea* han sido recientemente producidos para combatir las plagas agrícolas. Las formulaciones de *L. lecanii* son producidas en Holanda los nombres comerciales son Mycotal y Vertalec. Asimismo, los productos a base de *I. fumosorosea* se denominan PFR-97 y PreFeRal y son elaborados Bélgica (Charnley, 1997).

1.10. Interacción de los hongos entomopatógenos con productos fitosanitarios

Los hongos entomopatógenos se encuentran naturalmente en los ecosistemas y cumple un rol principal en el control de poblaciones de insectos. Tanto para la preservación de éstos microorganismos en los ambientes agroecológicos, como en su utilización en el marco del control biológico, es necesario conocer los posibles efectos de los productos fitosanitarios sobre los hongos entomopatógenos.

Los productos fitosanitarios tienen un amplio espectro de acción sobre los hongos entomopatógenos, observando efectos directos e indirectos. Los efectos directos se relacionan con la concentración aplicada, la naturaleza química del producto y los ingredientes activos utilizados en las formulaciones. Los efectos indirectos, son los observados en el campo, por la técnica de aplicación y el efecto residual de los agroquímicos (Alvez y López, 2008).

Pruebas de selectividad y compatibilidad de productos químicos con hongos entomopatógenos están siendo desarrollados *in vitro* bajo condiciones de laboratorio. Estas pruebas evalúan el efecto de insecticidas, herbicidas, fertilizantes y fungicidas sobre el crecimiento vegetativo, la esporulación, la germinación y la virulencia de los hongos entomopatógenos (Ramaraje *et al.*, 1967; Olmert y Kenneth, 1974; Clark 1980; Hall 1981; Perry y Latgé, 1983; González *et al.* 1995; Poprawski y Majchrowicz, 1995). De esta manera, se provee información concreta sobre la toxicidad de un producto fitosanitario, en función de la naturaleza química y concentración del producto químico y la especie fúngica evaluada. Sin embargo, un producto químico puede comportarse de diferente manera en el campo debido a los factores ambientales y operacionales. Actualmente, se están desarrollando estudios sobre el efecto de los productos fitosanitarios sobre la ocurrencia natural de epizootias de los hongos entomopatógenos (Johnson *et al.*, 1976; Smith y Hardee, 1996; Sosa-Gómez *et al.*, 2003) y sobre las poblaciones de insectos plagas presentes en el suelo (Mochi *et al.*, 2006; Bruck, 2009).

En algunos casos, la asociación de productos químicos con los hongos puede ocasionar un efecto sinérgico, observando una mortalidad superior de los insectos plagas al aplicar conjuntamente insecticidas y hongos entomopatógenos (Cuthbertson *et al.*, 2005).

El estudio de la compatibilidad de los agentes de control microbiológico (como los hongos entomopatógenos) con los productos fitosanitarios, es de gran importancia para realizar un eficaz control de los insectos plagas, ya que estos productos pueden ser aplicados de manera conjunta (en el caso de efectos nulos o sinérgicos) o simplemente intercalados (en el caso de efectos deletéreos). Además, estos estudios permitirán optimizar los procedimientos del manejo integrado de plagas y reducir el impacto ambiental en las zonas agroecológicas.

1.11. Hongos patógenos de “mosca blanca”

La mayoría de las citas sobre hongos patógenos de “mosca blanca” se relacionan con infecciones naturales llevadas a cabo por los hongos del orden Hypocreales y, en menor cantidad, por los hongos Entomophthorales (tabla 1). La mayoría de los aislamientos fúngicos fueron obtenidos de *B. tabaci* biotipo B y *T. vaporariorum* en diferentes regiones geográficas como India, Taiwán, Estados Unidos, Brasil, Colombia, México y Argentina (tabla 1). Dentro de los incluidos en el orden Hypocreales se reportaron las infecciones con los géneros *Aschersonia*, *Beauveria*, *Isaria* y *Lecanicillium*, y dentro de los Entomophthorales, con *Entomophthora spp*, *Conidiobolus spp* y *Zoophthora radicans*. Sorprendentemente, durante el año 2003 en Filipinas se recolectaron individuos de *Tetraleurodes acaciae*, una especie poco común de “mosca blanca”, infectados con *Entomophthora leyteensis* alcanzado una prevalencia entre 8 a 31% (Villacarlos *et al.*, 2003).

Bajo ciertas condiciones, los hongos entomopatógenos son capaces de desarrollar epizootias naturales y reducir las poblaciones de “mosca blanca” a niveles muy bajos. Por ejemplo, *I. fumosorosea* es capaz de generar epizootias durante o inmediatamente después de períodos prolongados de elevada humedad en invernáculos o a campo (Carruthers *et al.*, 1993; Lacey *et al.*, 1993, 1996). Sin embargo, la ocurrencia de epizootias naturales depende de las condiciones ambientales, las prácticas de producción y la densidad poblacional de la “mosca blanca” (Farias y Wraight, 2001).

Por otra parte, existen números estudios que demuestran el uso potencial de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico de la “mosca blanca”. Se han desarrollado varios métodos de bioensayos para evaluar la virulencia de los hongos entomopatógenos, como así también, la influencia de factores bióticos y abióticos sobre dicha actividad (Landa *et al.*, 1994, Vidal *et al.* 1997; Wraight *et al.* 1998, Lacey *et al.* 1999). Cientos de aislamientos fúngicos fueron evaluados sobre ninfas en condiciones de laboratorio demostrando la gran variabilidad en la virulencia de los aislamientos (Osborn y Landa, 1994; Wraight, 1998). Además, se evaluó el efecto de los hongos entomopatógenos sobre los diferentes estados de desarrollo de la “mosca blanca”, observando que los estadios ninfales presentaron porcentajes de mortalidad superiores a los observados en huevos y adultos expuestos a *B. bassiana* (Ramos *et al.*, 2000), *I. fumosorosea* (Lacey *et al.*, 1999), *I. farinosa* (Negasi *et al.*, 1998), *I. amoenorosea* (Candido, 1999) y *L. lecanii* (Meade y Byrne, 1991).

Tabla 1: Ocurrencia natural de hongos patógenos de “mosca blanca”

Espece fúngica	Insecto	Lugar	Referencia
Hypocreales			
<i>Aschersonia aleyrodis</i>	<i>B. tabaci</i>	Taiwan	Yen y Tsai, 1969
		Estados Unidos	Berger, 1921
<i>Aschersonia andropogonis</i>	<i>B. tabaci</i>	Taiwan	Yen y Tsai 1969
<i>Aschersonia goldiana</i>	<i>B. tabaci</i>	Brazil	Lourenção <i>et al.</i> , 1999
		Taiwan	Yen y Tsai, 1969
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>B. tabaci</i>	Israel	Ben-Ze'ev <i>et al.</i> , 1994
<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>B. tabaci</i>	India	Lacey <i>et al.</i> , 1993, 1996
	<i>B. argentifolii</i>	Indonesia	Humber, 2002
	<i>T. vaporarium</i>	Nepal	Lacey <i>et al.</i> , 1993
		Pakistán	Lacey <i>et al.</i> , 1993
		Trinidad	Hall <i>et al.</i> , 1994a
		Estados Unidos	Carruthers <i>et al.</i> , 1993
			Humber, 2002
			Carruthers <i>et al.</i> , 1993
		Brasil	Sosa-Gómez, 2002
		México	Garza Gonzales, 1993
		Colombia	López-Ávila <i>et al.</i> , 2001
		Cuba	Castineiras, 1995
		Ecuador	López-Ávila <i>et al.</i> , 2001
		Argentina	Scorsetti, 2007
<i>Isaria farinosa</i>	<i>B. tabaci</i>	Greece	Kirk <i>et al.</i> , 1993
	<i>T. vaporarium</i>	India	Nene, 1973
			Balakrishnan y Nene, 1980
		Argentina	Scorsetti, 2007
<i>Isaria javanica</i>	<i>T. vaporarium</i>	Argentina	Scorsetti, 2007
<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>B. tabaci</i>	Israel	Ben Ze'ev <i>et al.</i> , 1994
	<i>T. vaporarium</i>	España	Lacey <i>et al.</i> , 1993
		Brasil	Lourenção <i>et al.</i> , 2001
		Colombia	López-Ávila <i>et al.</i> , 2001
		Ecuador	López-Ávila <i>et al.</i> , 2001
		Mexico	Nier <i>et al.</i> , 1991
		Argentina	Scorsetti, 2007
<i>Lecanicillium longisporum</i>	<i>T. vaporarium</i>	Argentina	Scorsetti, 2007
<i>Lecanicillium muscarium</i>	<i>T. vaporarium</i>	Argentina	Scorsetti, 2007
Entomophthorales			
<i>Conidiobolus sp.</i>	<i>B. tabaci</i>	Israel	Ben Ze'ev, 1993;
		Estados Unidos	Carruthers <i>et al.</i> , 1993
<i>Entomophthora sp.</i>	<i>B. tabaci</i>	Estados Unidos	Carruthers <i>et al.</i> , 1993
<i>Zoophthora sp.</i>	<i>B. tabaci</i>	Israel	Ben-Ze'ev <i>et al.</i> , 1988
<i>Entomophthora leyteensis</i>	<i>Tetraleurodes acaciae</i>	Filipinas	Villacarlos <i>et al.</i> , 2003

En los últimos años se está focalizando la atención en el desarrollo y comercialización de micoinsecticidas para el control de la “mosca blanca” en Holanda, Bélgica, Estados Unidos, México, Colombia, y Brasil (Farias y Wraight, 2001). En el mercado mundial existen micoinsecticidas a base de *B. bassiana* (BotaniGard, Ago Biocontrol, Bea-Sin, Boveril PM, Mycotrol y Naturalis-L), *I. fumosorosea* (PreFeRal, Pae-Sin y PFR-97) y *L. lecanii* (Mycotal, Mycotrol WP, Vertalec) (Charnley, 1997; Farias y Wraight, 2001).

Numerosos estudios están siendo realizados para evaluar el efecto de los hongos entomopatógenos sobre poblaciones de “mosca blanca” en cultivos a cielo abierto (campo) o bajo cubierta (invernáculo). La mayoría de éstos estudios fueron realizados con formulaciones de *I. fumosorosea* (PFR-97) y *B. bassiana* (Mycotrol, Naturalis-L) observando que ambas especies fueron efectivas contra las poblaciones de “mosca blanca” presentes en cultivos de algodón (Wright *et al.*, 1993; Akey *et al.*, 1994), plantas cucurbitáceas (Wraight, 2000) y en cultivos protegidos bajo cubierta (Vidal, 1998; Fargues *et al.*, 2003). Generalmente, estos hongos entomopatógenos fueron empleados en múltiples aplicaciones realizadas cada 5 días obteniendo una mortalidad de las ninfas superior al 90 % (Wraight, 2000). Una simple aplicación de *I. fumosorosea* (PFR-97) en plantaciones de tomate y pepino bajo cubierta resultó en un 82 % a 88 % de mortalidad a los 14 días posteriores a la aplicación, y todas las ninfas con infección fúngica presentaron abundante esporulación siendo una fuente importante de inóculo para una segunda infección (Vidal *et al.*, 1998). Además, se reportó que la formulación a base de *L. lecanii* (Mycotal) controló efectivamente las poblaciones de “mosca blanca” bajo condiciones de invernadero (Ravensberg, 1994). En la mayoría de los ensayos realizados en plantaciones bajo cubierta, se observó una mayor eficiencia de los hongos entomopatógenos que en los ensayos a cielo abierto, lo cual se relacionó con la estabilidad de las condiciones ambientales (Farias y Wraight, 2001).

1.12. Situación actual de la “mosca blanca” en la Argentina

En la horticultura nacional, la “mosca blanca” es uno de los principales problemas sanitarios, ocasionando importantes daños en varios rubros del sector, algunos de alta significación económica y social. Si bien se constata su presencia tanto en cultivos protegidos como a cielo abierto, la mayor incidencia de estos insectos ocurre

en plantaciones bajo invernáculo, destacándose los cultivos de tomate, pimiento y melón.

Según el catálogo de Mound y Halsey (1978), en la Argentina se han citado las siguientes especies de “mosca blanca”:

- *Aleurothrixus* spp.
- *Aleurothrixus aepim* (Göldi)
- *Aleurothrixus floccosus* (Maskell)
- *Aleurothrixus porteri* Quaintance & Baker
- *Bemisia poinsettiae* Hempel
- El complejo *Bemisia tabaci* (Gennadius)
- *Nealeyrodes bonariensis* Hempel
- *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)
- *Leonardius lahillei* (Leonardi)
- *Metaleurodicus phalanoides* (Blanchard)

Además de estas especies citadas en el catálogo de Mound y Halsey (1978), se han citado, para nuestro país, dos especies de “mosca blanca” que no figuran en el mencionado catálogo. Una de ellas es *Australeurodicus lomatiae* Tapia y *Aleurodicus bondari* Costa Lima (Viscarret *et al.*, 1996, 2000).

Dentro de las especies de “mosca blanca” con mayor importancia económica en la República Argentina, se encuentra *T. vaporariorum* y *B. tabaci*, ya que la primera se convirtió en una de las principales plagas en la producción hortícolas del país, y la segunda por ser la plaga predominante en la zona norte del litoral (Viscarret *et al.*, 2000).

En el año 1994 ocurrió un fuerte ataque de *B. tabaci* en plantaciones de algodón en el noroeste argentino, lo que ocasionó la necesidad de estudiar esta plaga y por lo tanto aparecieron los primeros trabajos vinculados a la dinámica poblacional de esta “mosca blanca” y sus enemigos naturales (Botto *et al.*, 1999; Peterlin y Helman, 1994, 1999). Hasta el momento el complejo *B. tabaci* ha sido citado en la provincia de Santiago del Estero afectando algodón (Peterlin y Helman, 1994), en Tucumán sobre *Ipomoea* sp. y soja (Botto *et al.*, 1999), en Corrientes sobre cultivos hortícolas (Cáceres, 2004, 2005 b), en Entre Ríos sobre cultivos extensivos (Saluso, 2006), en el noroeste argentino (Ploper *et al.*, 1998) y en Buenos Aires (Viscarret *et al.*, 2000; Strassera, 2006).

Es importante destacar que en el año 1998 se ha registrado en el noroeste de la Argentina la presencia de geminivirus asociados al complejo *B. tabaci* en soja, tomate, poroto y pimiento (Ploper, 1998; Caceres, 2004). Asimismo, se ha detectado también un geminivirus, asociado con malezas, en la provincia de Córdoba (Truol *et al.*, 1998).

Actualmente, *T. vaporariorum* fue encontrada en cultivos hortícolas ubicados bajo cubierta en la ciudad de Rosario, provincia de Santa Fe (Gonsebatt *et al.* 2005) y en el Cinturón Hortícola Platense, provincia de Buenos Aires (Botto *et al.*, 1999), en donde es considerada una de las principales plagas limitantes en la producción de tomate bajo cubierta (Polack, 2005; Strassera, 2007). Por eso, INTA a través de la Estación Experimental de San Pedro, desarrolló un protocolo preliminar de Manejo Integrado de Plagas y enfermedades para la producción de tomate y pimiento bajo cubierta (Polack y Mitidieri; 2005; Polack, 2005). Este protocolo se basa en la implementación de monitoreos de la “mosca blanca”, determinación de los umbrales de acción y el desarrollo de técnicas de manejo complementarias, tales como el control cultural, el uso de variedades resistentes y tratamientos con insecticidas selectivos, a fin de obtener productos inocuos y proteger la fauna benéfica de presencia espontánea. Según este protocolo, los monitoreos de *T. vaporariorum* en tomate deben realizarse en el envés de las dos hojas superiores (1° y 2° hoja) para relevar la presencia de adultos y en las hojas del estrato medio (5° y 6° hoja) para las ninfas, y los umbrales de acción son de 10 adultos por hoja y/o 8 ninfas por foliolo. Los recuentos de adultos y ninfas de *B. tabaci* en pimiento se realizan en el envés de cuatro hojas del estrato medio de la planta y los umbrales de acción son de 5 adultos y/o 4 ninfas por hoja (Polack, 2005). El Protocolo de tomate ya ha sido aplicado a escala piloto en cultivos comerciales en la Estación Experimental de San Pedro, Cinturón Hortícola de Mar del Plata y norte del Gran Buenos Aires y desde el 2001 en establecimientos del Cinturón hortícolas Platense.

Además, se realizaron estudios sobre los diferentes métodos de control de *T. vaporariorum* en plantaciones de tomate con manejo convencional (basado en el control químico con aplicaciones por calendario), manejo orgánico (sin aplicación de agroquímicos) o con manejo integrado de plagas (Strassera, 2007, 2009).

Con respecto a los enemigos naturales de la “mosca blanca”, se citó la presencia de los siguientes depredadores en la provincia de Corrientes: *Eriopes connexa* (Coleoptera: Coccinellidae), *Allograpta exotica* (Diptera: Syrphidae), *Olla abdominalis* (Coleoptera: Coccinellidae), *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae), y

Chrysopidae. Además, se recolectaron las siguientes especies de parasitoides: *Encarsia protransvena*, *E. transvena*, *E. porteri*, *Eretmocerus paulistus*, *E. nigricephala* y *Signiphora* sp. (hiperparasitoide) (Caceres, 2004; Viscarret *et al.*, 2000).

En la Argentina existen varias referencias sobre la presencia y el uso de hongos patógenos de insectos plaga (Marchionatto, 1934; Yasem de Romero, 1984; López Lastra, 1988, 1989, 1990; Sosa-Gómez y Moscardi, 1991; Sosa-Gómez, 1999; Lecuona, 1999; Toledo *et al.* 2004, 2008; López Lastra y Scorsetti, 2006, 2007; Scorsetti, 2007, 2008). Sin embargo, la única referencias sobre los hongos patógenos de “mosca blanca” proviene de Scorsetti (2007, 2008) (tabla1), en donde se registró la ocurrencia natural de infecciones con *L. lecanii*, *L. longisporum*, *L. muscarium*, *I. fumosorosea* e *I. javanica* en individuos de *T. vaporariorum* provenientes de cultivos hortícolas de la provincia de Buenos Aires. Asimismo, se observó la presencia de individuos *B. tabaci* Biotipo B infectados con *I. fumosorosea* provenientes de la provincia de Corrientes. Los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de estas infecciones fueron preservados como cultivos axénicos *in vitro* en la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE. Además, se evaluó la patogenicidad de 5 aislamientos sobre ninfas IV de *T. vaporariorum* en condiciones de laboratorio, donde se observó un 52,6 %, 35 % y 65 % de mortalidad con los aislamientos de *L. lecanii* (CEP 057), *L. longisporum* (CEP 056) y *L. muscarium* (CEP 054), respectivamente. El aislamiento CEP 206 de *I. fumosorosea* fue evaluado sobre ninfas IV de *B. tabaci* biotipo B produciendo un 76,6 % (Scorsetti, 2008).

HIPOTESIS:

La apropiada utilización de los hongos entomopatógenos autóctonos permitiría controlar los insectos plagas en cultivos hortícolas, principalmente los insectos del grupo denominado “mosca blanca”.

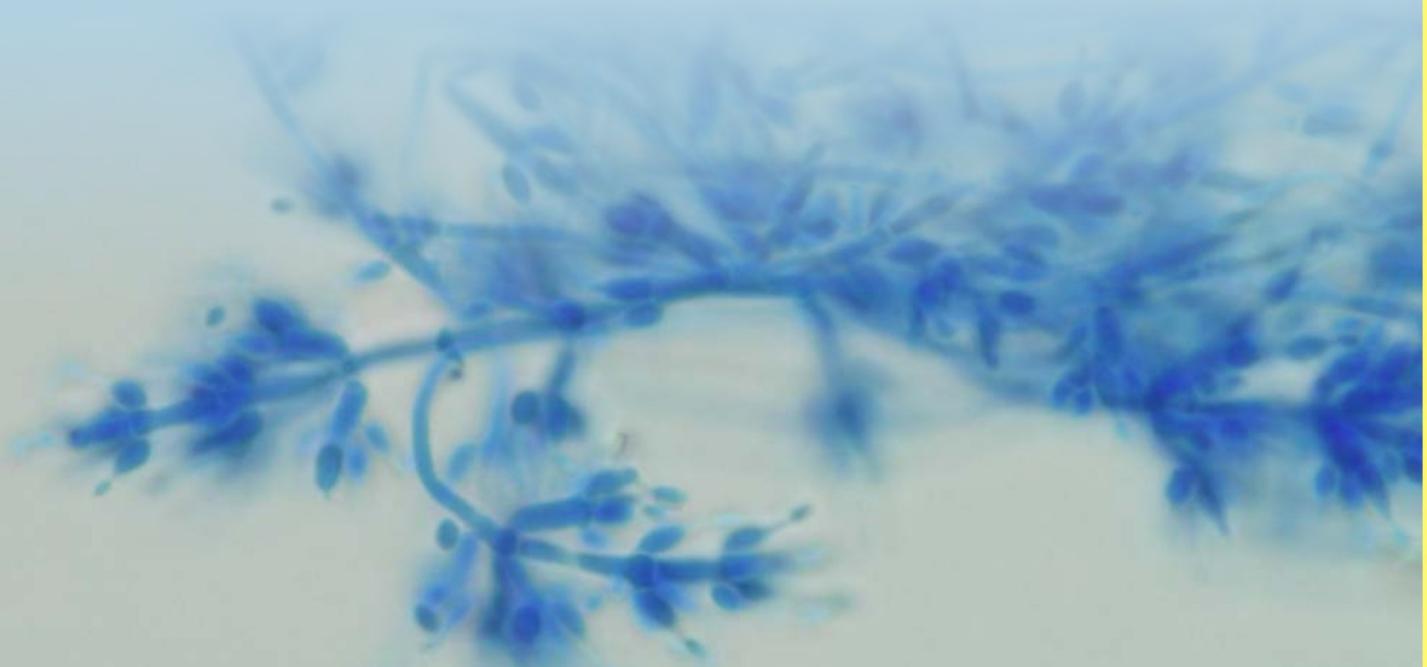
OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la diversidad, patogenicidad y variación estacional de los hongos patógenos de la “mosca blanca” en los sistemas hortícolas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Determinación de la prevalencia y variación estacional de los hongos entomopatógenos de la “mosca blanca” en cultivos hortícolas y su correlación con factores bióticos y abióticos, tales como la densidad y estacionalidad de los hospedadores, temperatura, lluvias, humedad relativa y fenología del cultivo.
- 2) Prospección, aislamiento e identificación de hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas orgánicos y convencionales.
- 3) Caracterización de los hongos entomopatógenos mediante métodos clásicos (observaciones morfológicas, estructurales y culturales) y técnicas de biología molecular.
- 4) Estimación de la patogenicidad y virulencia de los hongos entomopatógenos de “mosca blanca” en condiciones controladas de laboratorio y a campo.
- 5) Evaluar la interacción de los hongos entomopatógenos con fungicidas comerciales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y METODOS

2.1. Área de Estudio

Se realizó un relevamiento durante dos años consecutivos (2007-2009) de “mosca blanca” en diferentes regiones geográficas del país para la prospección de hongos entomopatógenos (tabla 2). Las áreas de estudio seleccionadas fueron quintas de producción hortícolas orgánica y convencional, donde las plantas se encontraron bajo cubierta (invernáculo) y “a cielo abierto” (campo) (figura 3 y 4). La mayoría de los establecimientos visitados se ubicaron en la provincia de Buenos Aires, y el resto a la provincia de Misiones, Neuquén y Río Negro (tabla 2). La localización geográfica de cada establecimiento se determinó con un instrumento de posicionamiento geográfico (GPS Efix, Garmin).

2.2. Cultivos hortícolas

En cada establecimiento los cultivos hortícolas se encontraron generalmente en invernáculos tipo “capilla” construidos con madera y polietileno de 100 micrones de espesor, y que abarcaron una superficie de 1000 m² a 3500 m². Las plantas se ubicaron en lomas y el riego se realizó por goteo. En estas estructuras se revisaron los siguientes cultivos hortícolas:

- Acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.)
- Apio (*Apium graveolens* L.)
- Arvejas (*Pisum sativum* L.)
- Berenjena (*Solanum melongena* L.)
- Chaucha (*Phaseolus vulgaris* L.)
- Lechuga (*Lactuca sativa* L.)
- Pepino (*Cucumis sativus* L.)
- Pimiento (*Capsicum annuum* L.)
- Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)
- Zapallito (*Cucurbita maxima* Duch.)

Cabe destacar que solo en la provincia de Neuquén y Río Negro la producción de tomate era realizada a cielo abierto y con riego por aspersión (figura 4).

Tabla 2: Sitios de muestreo, tipos de producción hortícolas y ubicación geográfica.

Establecimiento	Características de producción	Localidad	Partido/Provincia	Coordenadas Geográficas	Fecha del muestreo
Sitio 1	Orgánico	66 y 207	Partido de La Plata, Buenos Aires	S 34° 59' W 57° 59'	21/05/2007 01/11/2007
Sitio 2	Orgánico	Colonia Urquiza	Partido de La Plata, Buenos Aires	S 34° 56' 19'' W 58° 06' 4''	20/03/2007 23/05/2007
Sitio 3	Orgánico	Abasto	Partido de La Plata, Buenos Aires	S 34° 56' 41.0'' W 58° 07' 56.7''	2007-2009
Sitio 4	Convencional	Colonia Urquiza	Partido de La Plata, Buenos Aires	S 34° 56' 30.1'' W 58° 04' 53.7''	2007-2009
Sitio 5	Convencional	San Isidro	Posadas, Misiones	S 27° 23' W 55° 54'	28/11/2007
Sitio 6	Orgánico	Ameghino	Obera, Misiones	S 27° 29' W 58° 08'	01/12/2007
Sitio 7	Convencional	Senillosa	Neuquén	S 39° 01' 03.8'' W 68° 27' 49.4''	27/12/2007
Sitio 8	Convencional	Senillosa	Neuquén	S 39° 01' 34.0'' W 68° 27' 35.2''	27/12/2007
Sitio 9	Convencional	Roca	Río Negro	S 39° 02' 59.2'' W 67° 36' 38.5''	27/12/2007
Sitio 10	Convencional	Los Hornos	Partido de La Plata, Buenos Aires	S 34° 59' 9.0'' W 57° 59' 51.5''	2008-2009
Sitio 11	Convencional	Valle Hermoso	Mar del Plata, Buenos Aires	S 38° 02' 31.3'' W 57° 39' 11,0''	14/11/2008
Sitio 12	Convencional	Valle Hermoso	Mar del Plata, Buenos Aires	S 38° 02' 34,4'' W 57° 39' 15,7''	14/11/2008
Sitio 13	Convencional	Valle Hermoso	Mar del Plata, Buenos Aires	S 38° 01' 54.3'' W 57° 40' 15,1''	14/11/2008
Sitio 14	Orgánico	Estación Bartolomé Bavio	Partido de Magdalena, Buenos Aires	S 35° 08' W 57° 75'	05/05/2009

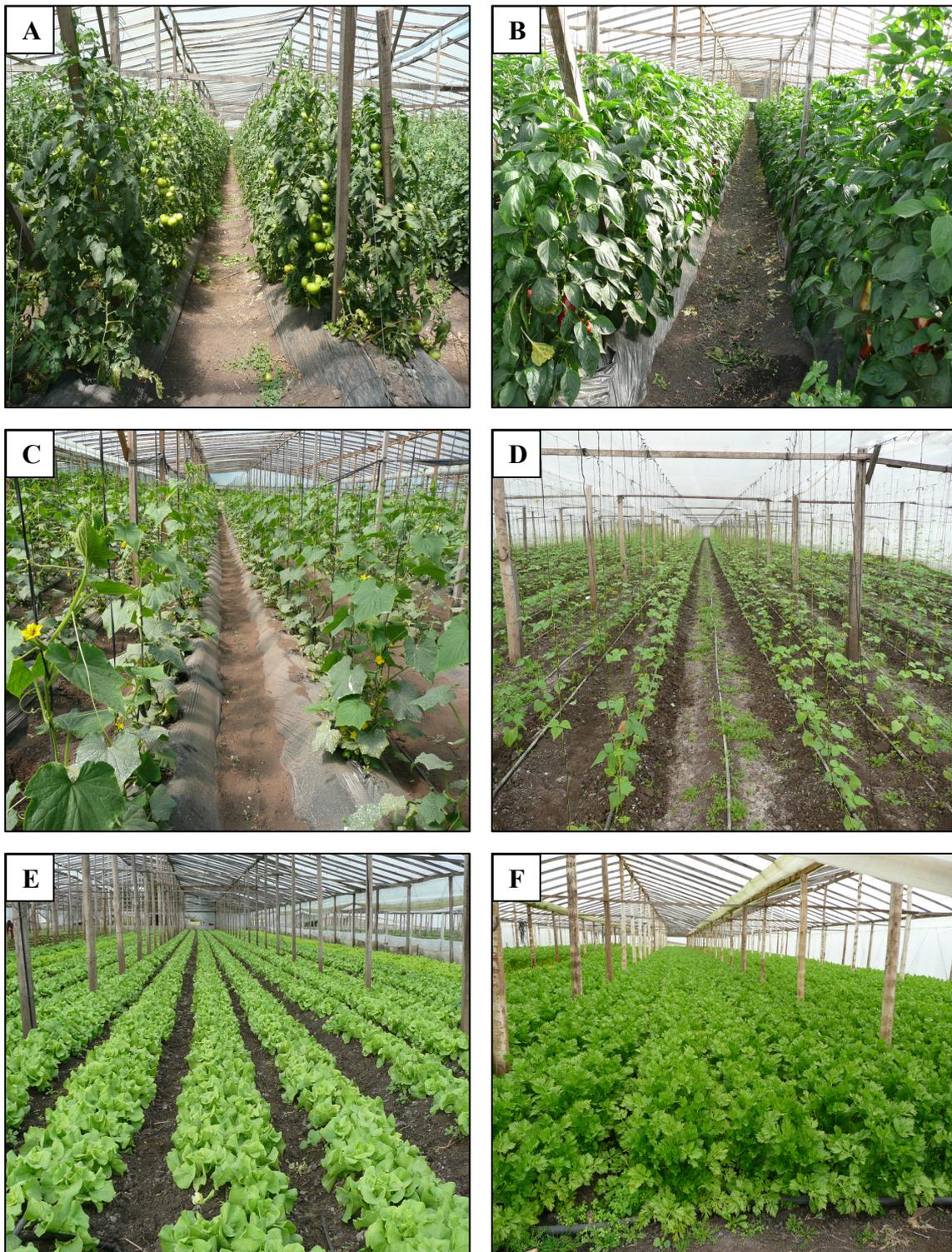


Figura 3: Producción de hortalizas bajo cubierta.

A: Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). B: Pimiento (*Capsicum annum* L.). C: Pepino (*Cucumis sativus* L.). D: Chaucha (*Phaseolus vulgaris*). E: Lechuga (*Lactuca sativa* L.). F: Apio (*Apium graveolens* L.).



Figura 4: Producción de tomate a cielo abierto en la provincia de Neuquén (sitio 8).

2.3. Tipo de Muestreo

En los establecimientos 3 y 4 se realizó un muestreo semanal en el cual se revisaron cinco plantas de cada uno de los bordes del invernáculo (entrada, lateral derecho, lateral izquierdo y salida) y 10 plantas al azar ubicadas en el centro del invernáculo. En cada planta se cuantificó el número de adultos en el envés de dos folíolos de las hojas del estrato superior (hoja 1 y hoja 2), y el número de ninfas en el envés de dos folíolos de las hojas del estrato medio (hoja 5 y 6) (Polack y Mitidieri, 2005). Este tipo de monitoreo permitió evaluar semanalmente la densidad de adultos y ninfas de “mosca blanca”, determinar la distribución de esta plaga en el invernáculo y la prospección de hongos patógenos de “mosca blanca”. Asimismo, se realizó la recolección de muestras de suelo en cada uno de los invernáculos con el fin de aislar hongos entomopatógenos.

En el resto de los sitios, como la frecuencia fue de una vez por año, el muestreo consistió en revisar dos hojas del estrato superior y del estrato medio de veinte plantas al azar dentro del invernáculo. En este caso, el muestreo permitió un relevamiento de insectos sanos e infectados.

Para los sitios localizados en la provincia de Buenos Aires, se consiguieron los datos de temperatura media diaria, humedad relativa y promedio mensual de precipitaciones a partir del Boletín Agrometeorológico Mensual de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

2.4. Recolección de insectos y detección de infecciones

En cada establecimiento, se recolectaron hojas con insectos muertos o infectados y se transportaron al laboratorio en bolsas plásticas acondicionadas en un recipiente refrigerado. Una vez en el laboratorio, se registró la presencia de ninfas y adultos con síntomas de infección mediante el uso de un microscopio binocular estereoscópico. Los ejemplares muertos fueron colocados en cámaras húmedas (cápsula de Petri esterilizada conteniendo papel de filtro humedecido con agua destilada estéril) e incubados a 25° C. Los insectos infectados fueron colocados directamente en medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar suplementado con 1 % de extracto de levadura (SDYA) mas Gentamicina y Cloranfenicol (Anexo).



Figura 5: Cámara húmeda

Los individuos con síntomas de infección fúngica se colocan sobre un portaobjeto limpio ubicado dentro de una cápsula de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril. Luego, las cápsulas se incuban a 25° C en condiciones de oscuridad para favorecer el desarrollo de las estructuras reproductivas del hongo.

2.5. Identificación y preservación de los insectos

La identificación de la “mosca blanca” se llevo a cabo mediante la observación microscópica de la “pupa” (ninfa del 4º estadio) y del “pupario” (exuvia de la ninfa IV) según las claves taxonómicas de Martin (1987) y Hodges y Evans (2005). Los adultos sanos de la “mosca blanca” fueron removidos de las hojas y guardados en alcohol 96° a -20° C para futuros trabajos de biología molecular.

En el caso de observar estadios inmaduros de la “mosca blanca” parasitados por *Eretmocerus sp.* o *Encarsia sp.*, se removieron del material vegetal usando una aguja entomológica y se guardó en caja de Petri hasta que eclosionara el parasitoides. Los parasitoides eclosionados fueron preservados en alcohol 70 % e identificados a nivel de género mediante las claves taxonómica de Polaszek *et al.* (1992) y Myartseva (2006).

2.6. Aislamiento de los hongos entomopatógenos

2.6.1. Aislamiento a partir del insecto infectado

Los individuos que desarrollaron síntomas de infección fúngica fueron removidos del material del campo utilizando una aguja entomológica estéril y se inocularon directamente en cápsulas de Petri conteniendo medio de cultivo Sabouraud dextrosa agar suplementado con extracto de levadura 1 % (SDYA) o medio agar extracto de malta suplementado con 2 % de extracto de levadura (MEA). Los medios de cultivo contenían antibióticos (Gentamicina y Cloranfenicol) (Anexo) para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes. Luego, las cápsulas fueron incubadas a 25° C en oscuridad durante 7 días a 10 días en estufa de cultivo.

2.6.2. Aislamiento a partir de muestras de suelo

Se recolectaron 2 muestras de suelo en cada invernáculo, correspondiendo a la parte central y a los laterales del invernáculo. Estas muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas plásticas y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su utilización. De cada muestra se tomo un gramo de suelo y se diluyó con 4 ml de agua destilada estéril. Luego se agitó vigorosamente durante 1 minuto usando un agitador (DeCaLab SRL) y se sembró 100 µl de la dilución en un medio selectivo con Dodine (acetato de N-dodecilguanidinio) (Bobersky y Tribe, 1980) (Anexo). Asimismo, se

utilizó como control positivo del medio selectivo una cepa de *B. bassiana* o de *I. fumosorosea* preservada en la colección de hongos entomopatógenos del CEPAVE. Todas las placas fueron incubadas a 25° C en oscuridad por 10 días para favorecer el desarrollo de estructuras fúngicas. Las colonias obtenidas fueron luego repicadas a medio de cultivo SDYA para permitir la esporulación del hongo y poder confirmar su identidad mediante observación microscópica de sus estructuras reproductivas.

2.7. Procedimientos con cultivos fúngicos

Para cada una de las metodologías realizadas los cultivos fúngicos fueron realizados bajo condiciones de esterilidad (en cámara de flujo laminar) y los medios de cultivo como los materiales fueron esterilizados en autoclave tipo Chamberlain a 120° C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

2.7.1. Metodología de aislamiento monospórico

Para la realización de esta metodología se utilizó el protocolo establecido por Lecuona (1996) con algunas modificaciones. Con la ayuda de una aguja entomológica se recolectó un insecto infectado proveniente del campo o de bioensayos y se colocó en un tubo con 1 ml de Tween 80 (Polisorbato de Sodio) 0,01 % (v/v) más 50 µl de antibióticos (ver Gentamicina y Cloranfenicol en Anexo). Luego, se agitó en un Vortex durante 1 a 2 minutos para preparar una suspensión de conidios. A partir de esta suspensión madre se prepararon diluciones seriadas, las cuales fueron agitadas vigorosamente con un Vortex. De las últimas diluciones (1/100 o 1/1000) se tomaron 100 µl y se inocularon en placas de Petri con medio de cultivo SDYA o MEA. Luego, se mantuvieron a 25 °C en oscuridad durante 24 a 48 hs para lograr el desarrollo de unidades formadoras de colonias (UFC). Se tomaron al menos 5 colonias aisladas de cada cepa fúngica y se sembraron en el centro de una nueva placa de Petri con medio de cultivo SDYA o MEA. Luego de 10 días de incubación a 25° C en oscuridad, se observó las características morfológicas de la colonia para luego poder identificar la especie fúngica.

2.7.2. Ensayo de viabilidad

Para poder determinar el porcentaje de germinación de cada aislamiento se realizó el ensayo de viabilidad (Lane *et al.*, 1988). Este ensayo consistió en realizar una suspensión de conidios en Tween 80 (Polisorbato de Sodio) 0,01 % (v/v), y ajustar su concentración a 1×10^5 conidios/ml mediante la utilización de un hemocitómetro (cámara de Neubauer). A su vez, se acondicionó una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril y conteniendo en su interior un portaobjetos esterilizado con 500 μ l de medio de cultivo SDYA (espesor de 2mm) (figura 6). Luego, se inocularon 100 μ l de la suspensión de conidios sobre la capa de medio de cultivo SDYA y se distribuyó homogéneamente con ayuda de una espátula de Drigalsky. Cada cápsula de Petri se colocó en una cámara incubadora a 25° C en oscuridad durante 24 hs y se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados en el microscopio con contraste de fases (400x) (Olympus CH30). Se consideró un conidio germinado cuando el tubo de germinación alcanzó la mitad de la longitud de la espora. Para cada aislamiento se evaluó el porcentaje de germinación por triplicado y en cada cámara de viabilidad se contó un total de 600 conidios.

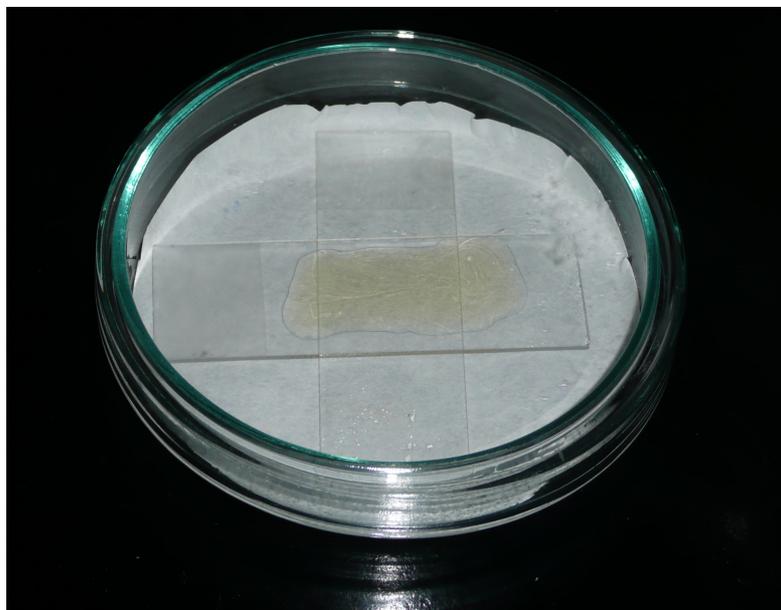


Figura 6: Cámara de viabilidad

Caja de Petri conteniendo 2 portaobjetos limpios ubicados perpendicularmente, donde uno de ellos tiene una delgada capa de medio de cultivo SDYA. En la base se encuentra un papel de filtro humedecido con agua destilada estéril.

2.7.3. Determinación del crecimiento radial y tasa de crecimiento

A partir de cultivos jóvenes de cada aislamiento fúngico (10 días de incubación a 25 °C) se cortaron cilindros de 4mm de diámetro mediante la utilización de un sacabocado. Cada cilindro fue ubicado individualmente en el centro de una cápsula de Petri de 90mm de diámetro que contenía SDYA más 1 % de extracto de levadura estéril (figura 7 A). Cada aislamiento fúngico fue ensayado por triplicado y conservado en cámara incubadora a 25° C en condiciones de oscuridad durante 10 días. Diariamente, se midió el diámetro de la colonia (figura 7 B) empleando una regla milimetrada y los valores obtenidos fueron indicados como crecimiento radial (Lacey y Brooks, 1997). La tasa de crecimiento se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de crecimiento diaria} = (\text{diámetro final} - \text{diámetro inicial}) / \text{número de días}$$

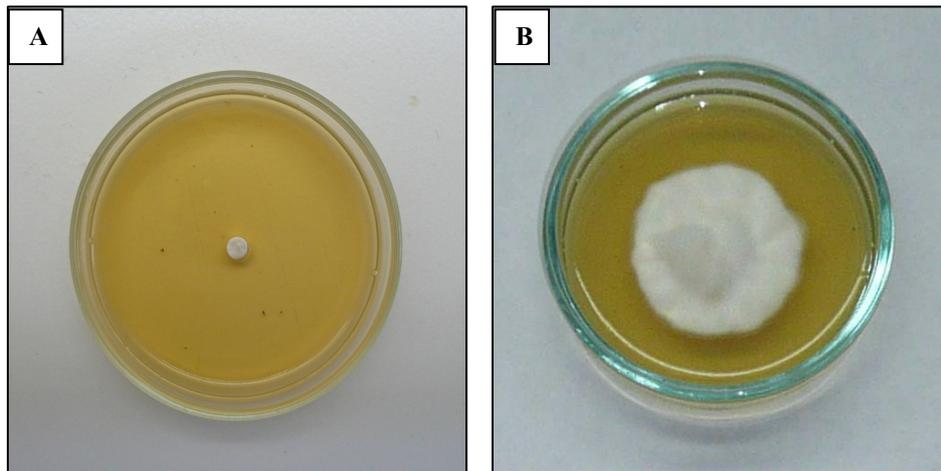


Figura 7: Determinación del crecimiento radial de los hongos entomopatógenos.

Se coloca un cilindro con un cultivo joven en el centro de una cápsula de Petri conteniendo SDYA estéril y diariamente se mide el diámetro de la colonia. **A:** inicio del experimento donde se observa el cilindro con cultivo joven (tiempo cero). **B:** desarrollo de una colonia luego de 10 días de incubación a 25° C en oscuridad.

2.8. Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por caracteres morfológicos

Los hongos aislados en cultivo *in vitro* fueron identificados a partir de la descripción macroscópica y microscópica de las estructuras vegetativas y reproductivas, para luego ser comparadas con claves taxonómicas. Para la identificación de las especies de Ascomycota se utilizaron las claves de Samson (1974), Samson *et al.* (1988), Tzean *et al.* (1997), Humber (1997) y Hodge (2006).

La caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos consistió en la descripción y medición de las estructuras fúngicas, como así también, determinar el crecimiento radial, la tasa de crecimiento y el porcentaje de germinación de los conidios.

2.8.1. Descripción macroscópica

A partir de los aislamientos monospóricos obtenidos de cada cepa fúngica, se observó el tipo de borde, el aspecto y color del envés y revés de la colonia. Asimismo, se midió el diámetro de las colonias luego de 10 días de incubación a 25° C en condiciones de oscuridad y se estimó la tasa de crecimiento como el diámetro de la colonia por el tiempo de incubación (mm/día).

2.8.2. Descripción microscópica

A partir de cultivos fúngicos esporulados se realizaron preparados ópticos con Azul de algodón-Lactofenol de Amann (0,001 % p/v) (Anexo) para visualizar la forma y dimensiones de los conidios, células conidiógenas (fiálides) e hifas de cada aislamiento. Para ellos se utilizó un microscopio óptico con contraste de fases (400x) (Olympus CH30) y se registró la observación mediante una cámara digital (Sony DSCP73). Para cada aislamiento se midió 25 unidades como mínimo, y luego se obtuvo el promedio y el error estándar de la misma.

2.8.3. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad y el crecimiento radial

Con el fin de evaluar el efecto de la temperatura sobre el desarrollo de las estructuras fúngicas de los hongos entomopatógenos de “mosca blanca”, se determinó el porcentaje de germinación y el crecimiento radial del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* incubado a 16°, 20°, 25° y 33° C.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de germinación del aislamiento CEP 315 se realizó el ensayo de viabilidad como fue descrito previamente (sección 2.7.2). A partir de un cultivo esporulado de CEP 315 se preparó una suspensión de conidios con Tween 80 0,01 % y se ajustó la concentración a 1×10^5 conidios/ml. 100 μ l de ésta suspensión fue inoculada sobre una capa delgada de medio de cultivo SDYA en una cámara de viabilidad (figura 6). 3 cámaras de viabilidad seleccionadas al azar fueron incubadas a una de las temperaturas establecidas (16°, 20°, 25° y 33° C) y al cabo de 24hs de incubación, se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados en el microscopio con contraste de fases. El porcentaje de germinación para cada temperatura se estimó mediante la observación de 600 conidios por cámara y en las 3 réplicas por tratamiento.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial de *I. fumosorosea* (CEP 315) se cuantificó la tasa de crecimiento como fue descrita en la sección 2.7.3. A partir de un cultivo joven de CEP 315, se recortaron cilindros de 4 mm de diámetro y se dispusieron en el centro de una capsula de Petri con SDYA estéril (figura 7). Tres cápsulas de Petri seleccionadas al azar fueron incubadas a 16°, 20°, 25° o 33° C durante 10 días. Al cabo de 10 días, se estimó la tasa de crecimiento como el diámetro de la colonia por día y aplicando la siguiente formula:

$$\text{Tasa de crecimiento diaria} = (\text{diámetro final} - \text{diámetro inicial}) / \text{número de días}$$

2.8.4. Análisis estadísticos

Los valores de porcentaje de germinación de los conidios y la tasa de crecimiento fueron analizados estadísticamente con el programa STATISTICA 7.0 (Stat Soft, Inc. 2007). Los valores de porcentaje de germinación de los conidios fueron transformados con la función arcoseno. Luego, se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene y las diferencias entre ellas se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con nivel de significancia del 95 %. Finalmente, se realizó un test de Fisher (LSD) para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

2.9. Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por medio de técnicas moleculares

2.9.1. Preparación del material fúngico

Los aislamientos seleccionados fueron 33, correspondiendo 21 a la especie *Isaria fumosorosea* (Wize), 3 a *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fries, 1 a *Isaria javanica* (Friederichs & Bally) Samson & Hywel-Jones, 1 a *Isaria amoenorosea* (Hennings) Samson, 3 a *Isaria tenuipes* (Peck) y 4 a *Isaria* sp. Estos aislamientos fueron obtenidos de la Colección Micológica del CEPAVE, La Plata, Argentina; de la Colección de Hongos Entomopatógenos de ARSEF, Nueva York, EEUU; y de la Colección de EMBRAPA Soja, Londrina, Brasil (tabla 13).

A partir de cultivos esporulados de cada aislamiento se obtuvieron cubos de 1 cm³ y se colocaron dentro de Erlenmeyers conteniendo 250 ml de medio de cultivo SDYA líquido estéril. Todos los Erlenmeyers fueron incubados a 25° C con agitación constante (100 rpm) durante 7 días. Una vez transcurrido dicho período, cada cultivo líquido fue filtrado con ayuda de una bomba de vacío para coleccionar el micelio. Este micelio fue lavado con agua destilada estéril para retirar los restos del medio de cultivo y almacenado a -20° C hasta su utilización en la extracción de ADN.

2.9.2. Extracción de ADN

La extracción y purificación del ADN fúngico se realizó según el protocolo de Rogers y Bendich (1988), en el cual se utilizó el detergente bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

El micelio de cada aislamiento de *Isaria* spp. fue triturado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se fraccionaron 300 mg de este polvo en un tubo de microcentrífuga (Eppendorf de 1,5ml) esterilizado y se adicionó 1 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, β -Mercaptoetanol 1 % y CTAB 2 %). La mezcla se incubó a 65 ° C durante una hora y se homogeneizó a intervalos de 15 minutos. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 6000 rpm (con rotor angular) por 10 minutos y se fraccionó el sobrenadante a un nuevo tubo tipo Eppendorf. Los ácidos nucleicos fueron extraídos con el agregado de cloroformo: alcohol isoamílico (en la proporción 24:1) y una centrifugación a 14.000 rpm por 15 minutos. Luego de la centrifugación, se obtuvieron dos fases, donde sólo la fase superior (acuosa) fue transferida a un nuevo tubo Eppendorf. La precipitación de

los ácidos nucleicos se realizó con el agregado de isopropanol frío y la consecuente incubación a -20°C durante toda la noche. El precipitado de ADN se recolectó por centrifugación a 14.000 rpm por 10 minutos y se lavó por el agregado de etanol 70 %. Finalmente, el ADN fue solubilizado en buffer TE pH 8 (Tris-HCl 1M pH 8, EDTA 0,5 M) con $40\mu\text{g/ml}$ de ARNasa y almacenado a -20°C hasta su utilización. Para estimar la cantidad relativa de ADN presente en cada muestra se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1 % y la cantidad de ADN se comparó con marcadores de masa molecular.

2.9.3. Amplificación y secuenciación de dos genes nucleares

En todos los aislamientos de *Isaria* se amplificó por PCR y secuenció dos regiones de genes nucleares, una de ellas corresponde al factor de elongación 1 α (EF1- α) y la otra a los espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal (ITS1-5,8S-ITS2).

La amplificación del fragmento de EF1- α fue realizada según el protocolo descrito por Rehner y Buckley (2005). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de $50\mu\text{l}$, en el cual se colocó $5\mu\text{l}$ de buffer de reacción 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8 y KCl 50 mM), $2\mu\text{l}$ de MgCl_2 50 mM, $2\mu\text{l}$ de una mezcla de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP) 2,5mM, $1\mu\text{l}$ de cada "primer" $10\mu\text{M}$, $0,2\mu\text{l}$ de *Taq* polimerasa 5 U/ μl , y 10ng de ADN. Los pares de "primers" utilizados fueron: 983F-2218R, 983F-1567R o 1577F-2218R (tabla 3). La amplificación de EF1- α se realizó en un termociclador (PTC 200 thermal cycler de MJ Research) y las condiciones programadas fueron de 9 ciclos iniciales donde la temperatura de hibridación de los "primers" disminuía gradualmente por ciclo y, a continuación, 36 ciclos con condiciones estándar para la PCR. Los 9 ciclos iniciales se realizaron de la siguiente manera: 2 minutos a 95°C , seguidos de 30 segundos a 66°C (disminuyendo un grado por ciclo) y finalmente a 72°C por 30 segundos. Los 36 ciclos siguientes consistieron en: 30 segundos a 94°C , 30 segundos a 56°C , 1 minuto a 72°C y un paso final de 10 minutos a 72°C .

El fragmento de ADN ribosomal conteniendo la región ITS1-5,8S-ITS2 fue amplificado según el protocolo descrito por Driver *et al.* (2000). Para la reacción de amplificación fueron utilizados los "primers" universales TW81 y AB28 (tabla 3), y las condiciones de PCR fueron establecidas según el protocolo descrito por White *et al.* (1990). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de $50\mu\text{l}$, en el cual se colocó $5\mu\text{l}$ de buffer de reacción 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8 y KCl 50 mM), $2\mu\text{l}$ de MgCl_2 50 mM, $2\mu\text{l}$ de una mezcla de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP) 2,5mM, $1\mu\text{l}$

de cada primers 10 μ M, 0,2 μ l de *Taq* polimerasa 5 U/ μ l, y 10 ng de ADN. La amplificación de ITS1-5,8S-ITS2 se realizó en un termociclador (PTC 200 thermal cyclor de MJ Research), el cual se programó con un paso inicial de 2 minutos a 95° C; seguido por 35 ciclos de un paso de desnaturalización del ADN a 95° C por 30 segundos, un paso de hibridación de los primers a 55° C por 30 segundos y un paso de elongación a 72° C por 1 minuto; y finalmente un paso a 72° C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,3 %, los cuales contenían bromuro de etidio para poder visualizar el ADN bajo luz ultravioleta. Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN fueron determinados por comparación con el marcador de peso molecular (λ 100pb).

El secuenciamiento de los genes nucleares se llevo a cabo a partir de productos de PCR purificados con el kit "Purelink-Quick Gel Extraction" (Invitrogen, 2009). El fragmento EF1- α fue secuenciado a partir de dos productos de PCR obtenidos con los pares de primers 983F-1567R y 1577F-2218R, y el fragmento ITS1-5,8S-ITS2 por el producto de PCR obtenido con el par de primers TW81-AB28. El secuenciamiento fue realizado por el método de Sanger *et al.* (1977) en el secuenciador ABI 3700 de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA Soja), en Londrina, Brasil.

Tabla 3: Primers utilizados para la amplificación por PCR

Gen	Primer	5'-secuencia-3'	Referencia
EF1	983F	GCY CCY GGH CAY GGT GAY TTY AT	Rehner and Buckley (2005)
EF1	2218R	ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG	Rehner and Buckley (2005)
EF1	1567R	ACH GTR CCR ATA CCA CCS ATC TT	Rehner and Buckley (2005)
EF1	1577F	CAR GAY GTB TAC AAG ATY GGT GG	Rehner and Buckley (2005)
ITS1-TS2	TW81	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	Driver <i>et al.</i> (2000)
ITS1-TS2	AB28	ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT	Driver <i>et al.</i> (2000)

2.9.4. Perfil de restricción de EF1- α e ITS1-5,8S-ITS2

El mapeo de sitios de restricción fue realizado para estudiar la variación genética entre las especies de *Isaria*. Para ellos los productos de PCR del gen EF1- α (obtenidos con el par de primer 983F y 2218R) y los productos de PCR del fragmento ITS1-5,8S-ITS2 (obtenido con los primer TW81F y AB28R) fueron digeridos con 6 enzimas de

restricción (*Alu* I, *Hae* III, *Mbo* I, *Hpa* II, *Taq* I y *Hha* I) de acuerdo al protocolo del distribuidor (Invitrogen). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l conteniendo 10 μ l del producto de PCR, 1,5 μ l del buffer 10X recomendando por el distribuidor, 0,5 μ l de la enzima de restricción 10 U/ μ l y agua destilada hasta alcanzar el volumen final. La mezcla fue incubada en un termociclador (PTC 200 thermal cycler de MJ Research) a 37° C durante 3 horas. Los fragmentos generados por la digestión fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % y visualizados bajo luz ultravioleta por el agregado de bromuro de etidio en el gel. Los pesos moleculares de cada fragmento fueron determinados por comparación con un marcador de peso molecular (λ 100pb).

2.10. Preservación de los cultivos fúngicos

Los aislamientos fúngicos obtenidos fueron depositados en las siguientes colecciones micológicas:

- USDA-ARS, Plant Protection Research Unit, US Plant, Soil & Nutrition Laboratory (ARSEF), Ithaca, N.Y., EE.UU.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, Centro Nacional de Pesquisa de Soja (EMBRAPA Soja), Londrina, Brasil.
- Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina.

Las técnicas empleadas para preservar los cultivos en la colección micológica del CEPAVE fueron las siguientes:

2.10.1. En glicerol 10 % estéril

A partir de un cultivo esporulados se cortaron cubos de 1 cm³ y se colocaron dentro de frascos estériles de 1,5 ml conteniendo glicerol 10% estéril. Estos frascos fueron mantenidos a -20° C (López Lastra *et al.*, 2001).

2.10.2. En agua destilada estéril

Se cortaron cubos de 1 cm³ de un cultivo esporulados y se colocaron dentro de tubos de centrifuga de 15 ml de polipropileno esterilizados (“tubo Falcon”) conteniendo 10ml de agua destilada estéril. Cada tubo se conservó en la heladera a 4° C.

2.10.3. En papel de filtro esterilizado

Sobre el micelio de un cultivo esporulado se colocaron tiras de papel de filtro previamente esterilizado y secado. Estos cultivos fueron mantenidos a 25° C durante 3 días para favorecer la adhesión de los conidios al papel. Luego, se removió el papel de filtro con ayuda de una pinza esterilizada y se dejaron secar al aire por 30 minutos dentro del flujo laminar. Los papeles de filtro conteniendo los conidios fueron ubicados individualmente en Eppendorf esterilizados y luego conservados en la heladera a 4° C.

2.10.4. Transferencias en cultivo o “repiques” sucesivos

Los cultivos fúngicos esporulados presentes en placas de Petri o en tubos de vidrio (“pico de flauta”) se conservaron en la heladera a 4° C.

2.11. Evaluación de la patogenicidad de los hongos

2.11.1. Cría artificial de “mosca blanca”

Con el fin de mantener una población de *T. vaporariorum* o de *B. tabaci* en condiciones de laboratorio, se colocaron semillas de tomate en un sustrato estéril compuesto de tierra y vermiculita. Un vez que las semillas germinaron y los plantines alcanzaron los 15 cm de altura, se traspasaron a macetas plásticas de 1000 cm³ de capacidad. Los plantines fueron colocados dentro de una caja de madera recubierta con tela de voile de 50 cm de altura, 40 cm de ancho y 25 cm de profundidad (figura 8 A). Abundante número de adultos de “mosca blanca” provenientes del muestreo fueron introducidos en cada caja durante 48 hs para favorecer la puesta de huevos en los plantines de tomate. Transcurridas las 48 hs se removieron todos los adultos de las plantas y las colonias se mantuvieron en una cámara incubadora a 25° C (Semedic S.R.L Buenos Aires, modelo I-290L) con un fotoperíodo de 12:12 luz/oscuridad (figura 8 B).



Figura 8: Colonias de *T. vaporariorum* en condiciones de laboratorio.

A: Caja de madera de 50x 40x 25cm recubierta con voile en donde se ubicaron las plantas de tomate con adultos de *T. vaporariorum*.

B: Cámara de incubación en donde se mantienen las colonias de *T. vaporariorum*.

2.11.2. Selección del aislamiento fúngico de mayor patogenicidad

Para evaluar los aislamientos fúngicos y poder seleccionar las cepas con mayor patogenicidad, se realizó el ensayo de Landa *et al.* (1994) con algunas modificaciones. A partir de la colonia de “mosca blanca” establecida en el laboratorio, se cortaron hojas de tomate y con ayuda de una aguja entomológica se extrajeron individualmente ninfas del estadio IV. Estos individuos fueron colocados en grupos de a diez sobre un portaobjeto esterilizado ubicado dentro de una cápsula de Petri con papel de filtro humedecido (figura 9). Asimismo, se preparó una suspensión de conidios en Tween 80 0,01 % a partir de cultivos fúngicos esporulados de 10 días y se ajustó la concentración a 1×10^7 conidios/ml mediante el uso de una cámara de Neubauer. La inoculación se llevo a cabo al colocar 3 μ l de la suspensión fúngica o 3 μ l de Tween 80 0,01% (control) sobre cada ninfa IV presente en el portaobjetos. Luego, las cápsulas de Petri fueron conservadas por 7 días a 25° C en condiciones de oscuridad para favorecer el desarrollo de la infección. Diariamente, se cuantificó el número de individuos con desarrollo externo de micelio y se confirmó la infección mediante la observación en

microscopio óptico con contraste de fases. Para cada tratamiento se calculo el porcentaje de mortalidad obtenido a los 7 días posteriores a la inoculación, como así también, se estimo el tiempo letal 50 y 90 (TL₅₀ y TL₉₀) con ayuda del programa Micro Probit (Sparks y Sparks, 1987).



Figura 9: Ensayo de patogenicidad para la selección de las cepas más virulentas.

Se colocaron en 10 ninfas del estadio IV de *T. vaporariorum* o *B. tabaci* sobre un portaobjeto estéril y se inoculo 3 μ l de una suspensión fúngica (1×10^7 conidios/ml) o Tween 80 0,01 (control) en cada ninfa. Cada cápsula de Petri fue mantenida a 25° C en condiciones de oscuridad y diariamente se midió el porcentaje de mortalidad.

2.11.3. Susceptibilidad de los estados de desarrollo de *T. vaporariorum* al aislamiento fúngico seleccionado

A partir de la cepa con mayor porcentaje de mortalidad se realizaron bioensayos para determinar la susceptibilidad de cada estado de desarrollo de *T. vaporariorum*. En primera instancia, se sincronizo el ciclo de vida de *T. vaporariorum* en condiciones controladas de laboratorio (25° C con fotoperíodo 12hs luz y 12hs oscuridad). Para ello se colocaron entre 50 a 100 adultos en plantas de tomate presentes en jaulas de madera ubicadas dentro de una incubadora (figura 8). Los adultos permanecieron en las jaulas solo por 48 hs para permitir la puesta de huevos y luego fueron removidos con ayuda de un aspirador bucal. Al cabo de 2, 7, 12, 15 y 18 días después de la remoción de los adultos fueron obtenidos todos los estados inmaduros de *T. vaporariorum* (huevos, ninfas I, ninfas II, ninfas III y ninfas IV).

Una vez sincronizado el ciclo de vida de *T. vaporariorum* en condiciones de laboratorio, se cortaron hojas de tomate que contenían cada uno de los estados de desarrollo y se cuantificó el número de individuos presentes por hoja.

Los bioensayos con los estados inmaduros consistieron en la aspersión de 400 μ l de una suspensión de conidios (1×10^7 conidios/ml) o Tween 80 0,01 % (control) sobre el envés de hojas de tomate que presentaban individuos de *T. vaporariorum*. La inoculación de los tratamientos se realizó mediante la utilización de un aspersor de vidrio de 50 ml (figura 10). A continuación, las hojas de tomate fueron colocadas en recipientes con agua destilada y cubiertas con bolsas de polipropileno (figura 10). Todas las hojas fueron mantenidas durante 7 días en cámara incubadora a 25° C con fotoperíodo de 12hs luz y 12hs oscuridad. Los bioensayos fueron realizados con al menos 20 individuos por hoja y con tres replicas por tratamiento. Diariamente, se cuantificó el número de individuos que presentaban síntomas de infección micótica y al cabo de 7 días se estimó el porcentaje de mortalidad promedio.



Figura 10: Bioensayo con estados inmaduros de *T. vaporariorum*

Hojas de tomate que presentaban huevos o ninfas fueron rociadas con una suspensión de conidios o Tween 80 0,01 % (control) y luego ubicadas con el peciolo dentro de un frasco con agua destilada. Todas las hojas fueron cubiertas con una bolsa de polipropileno e incubadas a 25° C con fotoperíodo de 12:12 luz: oscuridad durante 7 días. Diariamente se midió el número de individuos infectados y se estimó el porcentaje de mortalidad a los 7 días post-inoculación.

Para los bioensayos con adultos de *T. vaporariorum* se colocaron hojas de tomate o chaucha en cápsulas de Petri juntos con 20 adultos extraídos de la colonia de “mosca blanca” (figura 11). En cada hoja se roció con 400µl de una suspensión de conidios (1×10^7 conidios/ml) o Tween 80 0,01 % (control) con ayuda de un aspersor de vidrio (figura 10). Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado y mantenidos durante 7 días en cámara incubadora a 25° C con fotoperíodo de 12hs luz y 12hs oscuridad. Diariamente, se midió el número de adultos muertos y con síntomas de infección fúngica, los cuales fueron colocados en cámara húmeda para favorecer el desarrollo de micosis y confirmar la infección. Al cabo de 7 días se estimó el porcentaje de mortalidad promedio.



Figura 11: Bioensayo con adultos de *T. vaporariorum*

Se colocaron alrededor de 20 adultos sobre hojas de chaucha ubicados dentro de una cápsula de Petri y luego se rociaron con una suspensión de conidios o Tween 80 0,01 % (control). Todas las cápsulas fueron incubadas durante 7 días a 25° C con fotoperíodo 12:12 luz: oscuridad. Diariamente se cuantificó el número de adultos muertos y con síntomas de infección micótica para luego estimar el porcentaje de mortalidad promedio a los 7 días post-inoculación.

2.11.4. Estimación de la concentración letal 50 y 90 (CL₅₀ y CL₉₀)

Después de estimar el estadio de *T. vaporariorum* más susceptible se evaluó sobre éste 5 concentraciones del aislamiento fúngico más virulento para así determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) y 90 (CL₉₀). A partir de cultivos esporulados se prepararon 5 suspensiones de conidios (1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios/ml), las cuales fueron rociadas sobre el envés de hojas de tomate que presentaban ninfas del estadio III de *T. vaporariorum* (20 individuos por hoja). Luego de la aspersión, las hojas fueron colocadas con sus pecíolos dentro de frascos con agua destilada y cubiertas con bolsas de polipropileno. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicados y mantenidos durante 7 días en cámara incubadora a 25° C con fotoperíodo de 12hs luz y 12hs oscuridad. Diariamente, se cuantificó el número de individuos con síntomas de infección micótica y al cabo de 7 días se estimó el porcentaje de mortalidad para cada concentración del aislamiento fúngico. Con ayuda del programa Micro Probit (Sparks y Sparks, 1987) se relacionaron los datos de mortalidad con los de concentración y se estimó la concentración letal con la cual se obtiene un 50 % y 90 % de individuos muertos (CL₅₀ y CL₉₀).

2.11.5. Evaluación de la susceptibilidad de ninfas de *T. vaporariorum* parasitadas con *Eretmocerus* sp. al hongo entomopatógeno *I. fumosorosea*

Otro factor importante de evaluar es la susceptibilidad de los parasitoides de “mosca blanca” al aislamiento seleccionado. Para ellos se seleccionaron hojas de tomate que contenían 10 ninfas de *T. vaporariorum* parasitadas con *Eretmocerus* sp., las cuales fueron fácilmente reconocidas por su coloración anaranjada (figura 12). Estas hojas fueron rociadas con 400 µl de una suspensión de conidios (1×10^7 conidios/ml) del aislamiento fúngico seleccionado o Tween 80 0,01 % (control). Todas las hojas fueron colocadas individualmente con sus pecíolos en agua destilada y cubiertas con una bolsa de polipropileno. Luego, fueron mantenidas en una cámara incubadora a 25° C con fotoperíodo 12hs de luz y 12 hs de oscuridad. Diariamente, se cuantificó el número de adultos de *Eretmocerus* sp. que emergieron y el número de ninfas con infección micótica. Al cabo de 7 días post-inoculación se determinó el porcentaje de mortalidad promedio para cada tratamiento.



Figura 12: Ninfas de *T. vaporariorum* sanas y parasitadas con *Eretmocerus* sp.

La presencia del endoparasitoide *Eretmocerus* sp. en ninfas de *T. vaporariorum* genera un cambio en la coloración de éstos individuos, siendo de color blanca (ninfa sana) a color naranja (ninfa parasitada).

2.11.6. Análisis Estadísticos

Los valores del porcentaje de mortalidad fueron transformados a arcoseno y se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante un test de Levene. Para determinar si las diferencias entre los distintos aislamientos fueron significativas se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con 95 % de significancia, y luego un test de Tukey ($p < 0,05$) para comparar las medias entre pares de tratamientos. Además, se realizó un test de Student ($p < 0,05$) para verificar las diferencias significativas entre las medias del porcentaje de mortalidad de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA 7.0 (Stat Soft, Inc. 2007).

2.12. Evaluación de la interacción de *I. fumosorosea* con funguicidas

2.12.1. Selección de los funguicidas y su preparación

Los funguicidas fueron seleccionados por su utilización frecuente en los sitios de muestreo visitados, los cuales correspondieron a 7 formulaciones químicas y una formulación biológica a base del hongo de suelo *Trichoderma harzianum* (tabla 4). La preparación de cada funguicida consistió en la emulsión en agua destilada estéril hasta ajustar su concentración a cantidades recomendadas por el productor. Las emulsiones fueron preparadas en el momento a ser utilizadas y preservadas de la luz solar.

2.12.2. Ensayo de viabilidad con fungicidas

Se prepararon suspensiones de conidios de dos aislamientos de *I. fumosorosea* (CEP 304 y CEP 315) y se ajustó a una concentración de 1×10^5 conidios/ml con una cámara de Neubauer. Luego, se colocó 100 μ l de cada suspensión sobre una capa delgada de SDYA ubicada en un portaobjeto estéril (cámara de viabilidad) y se distribuyó uniformemente utilizando una espátula de Drigalsky previamente esterilizada en alcohol. A continuación, se prepararon las emulsiones de los fungicidas y se pulverizó cada fungicida sobre la capa delgada de SDYA (volumen aplicado: 300 μ l) (figura 13). El tratamiento control se realizó pulverizando agua destilada estéril, en lugar de los fungicidas. Cada cápsula de Petri se colocó en una cámara incubadora a 25 °C en oscuridad durante 24 hs y se observó el número de conidios germinados y no germinados en el microscopio con contraste de fases. Para cada tratamiento se cuantificó un total de 600 conidios y se realizaron tres replicas.

Tabla 4: Lista de fungicidas con su nombre comercial, tipo de fungicida y dosis recomendadas.

Principio activo	Nombre comercial	Empresa	Clase toxicológica*	Tipo de fungicida	Concentración*
Propamocarb	PREVICUR	Bayer	III	Fungicida Sistémico	0.15% P/V
Fenarimol	RUBIGAN	Brometan	II	Fungicida Sistémico	0.05% P/V
Triadimefón	BAYLETON	Bayer	IV	Fungicida Sistémico	0.05% P/V
Procimidona	SUMILEX	Ando	IV	Fungicida Sistémico	0.1% P/V
Azoxistrobina	AMISTAR	Syngenta	IV	Fungicida Sistémico y de contacto	0.04% P/V
Carbendazim	CARBENDAZIM	Reposo	IV	Fungicida Sistémico	0.15% P/V
Oxicloruro de Cobre	OXICLORURO DE COBRE	Nufarm	III	Fungicida y Bactericida	0.15% P/V
<i>Trichoderma harzianum</i>	TRICHO-D	EcoCERT	IV	Fungicida	0.5% P/V

* Según la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (Casafe) (2007).

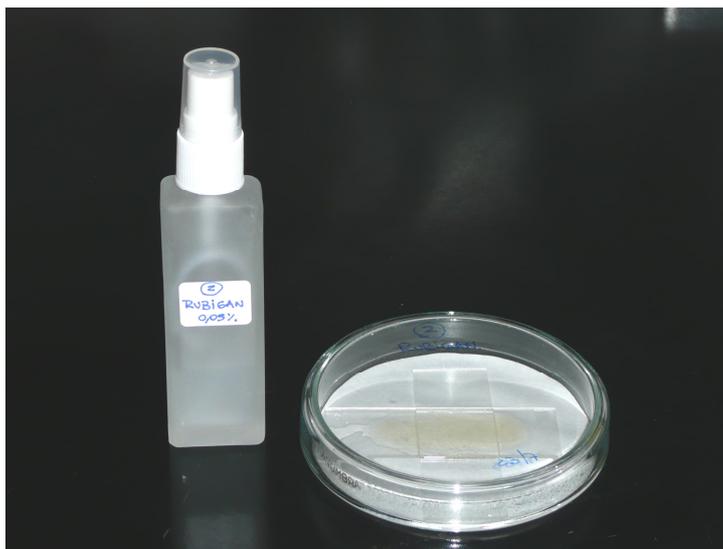


Figura 13: Placa de viabilidad en la cual se pulverizó la emulsión del fungicida.

Se colocó una alícuota de la suspensión de conidios sobre una capa delgada de medio de cultivos SDYA ubicado sobre un portaobjeto. Luego, con ayuda de un aspersor se rocío la emulsión del fungicida y se humedeció el papel de filtro para generar un ambiente saturado en humedad. Las cápsulas de Petri fueron incubadas a 25° C durante 24 hs y, una vez transcurrido el tiempo, se cuantificó el porcentaje de conidios germinados en cada uno de los tratamientos.

2.12.3. Crecimiento radial en contacto con fungicidas

En cápsulas de Petri de 90mm de diámetro que contenían medio de cultivo SDYA con 1 % de extracto de levadura fue aplicado 300 µl de cada uno de los fungicidas o agua destilada estéril (control) y esparcido uniformemente sobre toda la superficie del medio con ayuda de una espátula de Drigalsky. Luego estas placas fueron abiertas dentro de un flujo laminar durante 10 minutos para permitir la absorción del fungicida al medio de cultivo. Se cortaron cilindros de 4mm de diámetro de cultivos fúngicos jóvenes (10 días de incubación a 25° C) mediante la utilización de un sacabocado y se colocaron individualmente en el centro de cada cápsula de Petri que contenía SDYA más el agregado de cada uno de los fungicidas. Todos los tratamientos fueron incubados a 25° C en condiciones de oscuridad durante 10 días. Cada tratamiento fue realizado por triplicado y el ensayo completo fue repetido tres veces. Diariamente, se midió el diámetro de la colonia empleando una regla milimetrada y los valores obtenidos fueron indicados como crecimiento radial. La tasa de crecimiento se estimó de la siguiente manera:

$$\text{Tasa de crecimiento diaria} = (\text{diámetro final} - \text{diámetro inicial}) / \text{número de días}$$

2.12.4. Ensayos de patogenicidad en presencia de fungicidas

Para evaluar el efecto de los fungicidas sobre la virulencia de los aislamientos de *I. fumosorosea*, se realizaron pruebas de patogenicidad sobre *T. vaporariorum* en presencia de los fungicidas. En primero lugar, se tomaron cultivos esporulados de cada aislamiento y se prepararon suspensiones de conidios (1×10^7 conidios/ml) con Tween 80 0,01 %. Asimismo, cada uno de los fungicidas fue emulsionado en agua destilada estéril hasta ajustar su concentración. Luego, se extrajeron ninfas del estadio IV de *T. vaporariorum* a partir de la colonia establecida en el laboratorio y se dispusieron en grupos de 10 individuos sobre portaobjetos estériles ubicado dentro de una cápsula de Petri (cámara húmeda, figura 4). Sobre cada individuo fue aplicada una gota (3 μ l) de uno de los siguientes tratamientos:

- Tween 80 0,01 % (control).
- Suspensión de 1×10^7 conidios/ml de cada aislamiento de *I. fumosorosea*.
- Emulsión de cada fungicida.
- Suspensión de conidios de cada aislamiento de *I. fumosorosea* más la emulsión de cada fungicida, para lo cual se realizó una mezcla con volúmenes iguales de cada uno.

Todas las cámaras húmedas fueron mantenidas por 7 días a 25° C en condiciones de oscuridad. Cada tratamiento fue realizado por triplicado y el ensayo fue repetido tres veces. Diariamente, se cuantificó el número de individuos muertos o con infección micótica, los cuales fueron observados bajo microscopio estereoscópico para identificar las estructuras fúngicas específicas. Al cabo de 7 días post-inoculación se estimó el porcentaje de mortalidad promedio de cada tratamiento.

2.12.5. Análisis Estadísticos

Los valores correspondientes al porcentaje de germinación y al porcentaje de mortalidad fueron transformados mediante la función arcoseno para estabilizar la varianza. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante un test univariado de Levene, y luego se realizó un ANOVA con nivel de significancia del 95 %. Las diferencias significativas en las varianzas o medias de cada tratamiento fueron obtenidas mediante un test de Tukey ($p < 0,05$) y representadas con letras diferentes. Para comparar las medias de cada aislamiento (CEP 304 y CEP 315) se realizó un test de Student ($p < 0,05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA 7.0 (Stat Soft, Inc. 2007).

2.13. Producción masiva del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*

Los pasos para la producción masiva fueron llevados a cabo según Espinel *et al.*, 2008. Se realizó la selección de un sustrato adecuado para la producción masiva del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* evaluando el rendimiento de conidios por gramo de sustrato y el porcentaje de germinación de los conidios obtenidos por este método. Luego, se procesó el sustrato seleccionado y se obtuvo una suspensión de conidios, a la cual se le determinó el rendimiento de conidios, la viabilidad de los conidios y su patogenicidad en condiciones de laboratorio.

Con fines prácticos se define a la suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) obtenida a partir de producción masiva como “S.C.P.M”.

2.13.1. Selección de sustratos para la producción masiva de *I. fumosorosea*

Con el fin de seleccionar el sustrato de producción masiva más adecuado para la multiplicación del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*, se evaluaron 6 sustratos diferentes: arroz parboil, arroz integral, arroz yamaní, arroz rojo (granos de *Oryza sativa*), trigo (granos de *Triticum aestivum*) y salvado de trigo (cubierta interna del grano de *T. aestivum*). En bolsas de polipropileno se colocaron 100gr de cada sustrato (figura 14 A), y se realizó una esterilización en una autoclave a una atmósfera de presión durante 20 minutos. Luego, en cada bolsa se colocaron 200 ml de agua destilada y el sustrato se llevó a ebullición a “baño de maría” por 30 minutos. Nuevamente se esterilizaron las bolsas y se colocaron en una estufa a 60° C durante toda la noche para favorecer el secado de los granos (figura 14 B). A continuación, las bolsas fueron abiertas y mantenidas dentro de una cámara de flujo laminar con luz UV encendida durante 40 minutos para realizar una esterilización superficial del sustrato y de las bolsas de polipropileno. La inoculación del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* se realizó mediante el agregado de 2 ml de una suspensión de 1×10^6 conidios/ml por bolsa de sustrato y luego, cada bolsa se agitó suavemente para lograr una distribución homogénea de la suspensión de conidios sobre los sustratos. Por cada sustrato se elaboraron tres bolsas de polipropileno y el ensayo fue realizado 3 veces consecutivas. Todas bolsas fueron colocadas en una cámara incubadora (figura 14 D) a 25° C en condiciones de oscuridad durante 10, 20 y 30 días para favorecer el desarrollo de biomasa fúngica. Una vez transcurrido el período de incubación, en cada sustrato se

determinó el rendimiento de conidios por gramo de sustrato, y el porcentaje de germinación de los conidios.

2.13.2. Evaluación del rendimiento de los conidios

A partir de cada una de las bolsas incubadas durante 10, 20 y 30 días, se tomó un gramo de sustrato y se colocó dentro de un tubo de centrífuga tipo “falcon”, en el cual se adicionó 10 ml de Tween 80 0,01 %. La mezcla fue agitada vigorosamente en un agitador para obtener una suspensión homogénea de conidios. Se realizaron diluciones seriadas a partir de la suspensión madre y las diluciones 1/100 y 1/1000 fueron analizadas en hemocitómetro (cámara de Neubauer) para cuantificar el número de conidios por ml de la dilución. Este valor fue utilizado para estimar el rendimiento expresado como cantidad de conidios por gramo de sustrato.

2.13.3. Evaluación de la viabilidad de los conidios

A partir de cada una de las bolsas de polipropileno que contenían los sustratos, se tomó un gramo de cada sustrato y se realizó una dilución con Tween 80 (0,01% v/v) hasta ajustar la concentración a 1×10^5 conidios/ml. Luego, 100 μ l de las diluciones fueron inoculados sobre una capa delgada de SDYA ubicada en un portaobjeto estéril dentro de una cámara de viabilidad (figura 6). Por cada sustrato se prepararon 3 cámaras de viabilidad con el fin de generar replicas. Todas las cámaras fueron incubadas a 25° C en condiciones de oscuridad por 24 hs. Una vez transcurrido el período de tiempo, se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados mediante la observación en un microscopio con contraste de fases (Olympus CH30). El porcentaje de germinación promedio se estimó al cuantificar 600 conidios por cápsula y en tres replicas.

2.13.4. Análisis estadísticos de los datos

En primera instancia los datos de rendimiento fueron transformados con la función raíz cuadrada y los valores de porcentaje de germinación con la función arcoseno. A continuación, se comprobó la homogeneidad de la varianza con un test de Levene y se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con nivel de significancia de 95 %. Las diferencias significativas entre los tratamientos fueron detectadas mediante un test de Tukey ($p < 0,05$). En el caso que no se comprobó la homocedasticidad de los valores, se realizó un test no paramétrico (Kruskal – Walis) y un test no paramétrito tipo

Tukey ($p < 0,05$). Además, se realizó un ANOVA de dos vías para identificar si existe interacción entre el factor sustratos y los días de incubación para cada variable (rendimiento y germinación). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA 7.0 (Stat Soft, Inc. 2007).

2.13.5. Elaboración de una suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) a partir de la producción masiva (S.C.P.M)

Se colocaron 100gr de “arroz parbolizado” en bolsas de polipropileno (figura 14 A), las cuales fueron esterilizadas en autoclave a una atmósfera de presión durante 20 minutos. Luego de la esterilización, en cada bolsa se colocó 200ml de agua destilada y se hirvió el arroz a “baño de maría” por 30 minutos. Nuevamente se esterilizaron las bolsas y se colocaron en una estufa a 60° C durante toda la noche para favorecer el secado de los granos de arroz (figura 14 B). A continuación, las bolsas fueron abiertas y mantenidas dentro de un flujo laminar con luz UV encendida por 40 minutos para realizar una esterilización superficial del sustrato y de las bolsas de polipropileno. La inoculación del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* se realizó mediante el agregado de 3 cubos de 1 cm³ de un cultivo esporulado en cada bolsa (figura 14 C). Luego, las bolsas fueron colocadas en una cámara incubadora (figura 14 D) a 25° C en condiciones de oscuridad durante 15, 20, 25, 30 y 35 días para favorecer el desarrollo de biomasa fúngica. Una vez transcurrido el tiempo, los granos de arroz fueron colocados en un vaso de precipitado donde se colocó Tween 80 0,01 % y se agitó vigorosamente con ayuda de una cuchara metálica para extraer las estructuras fúngicas (figura 15 A). Esta mezcla fue filtrada con un colador para remover los granos de arroz (figura 15 B) y la solución líquida obtenida fue nuevamente filtrada con tela de voile para quitar partículas del sustrato (figura 15 C y D). Finalmente, el material líquido filtrado fue almacenado en la heladera a 4° C y se lo denominó “suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) originado por producción masiva” (S.C.P.M) (figura 15 E). Esta S.C.P.M fue utilizada para determinar el rendimiento de conidios por gramo de arroz, el porcentaje de germinación de los conidios y su patogenicidad sobre individuos de *T. vaporariorum* en condiciones de laboratorio y a campo.

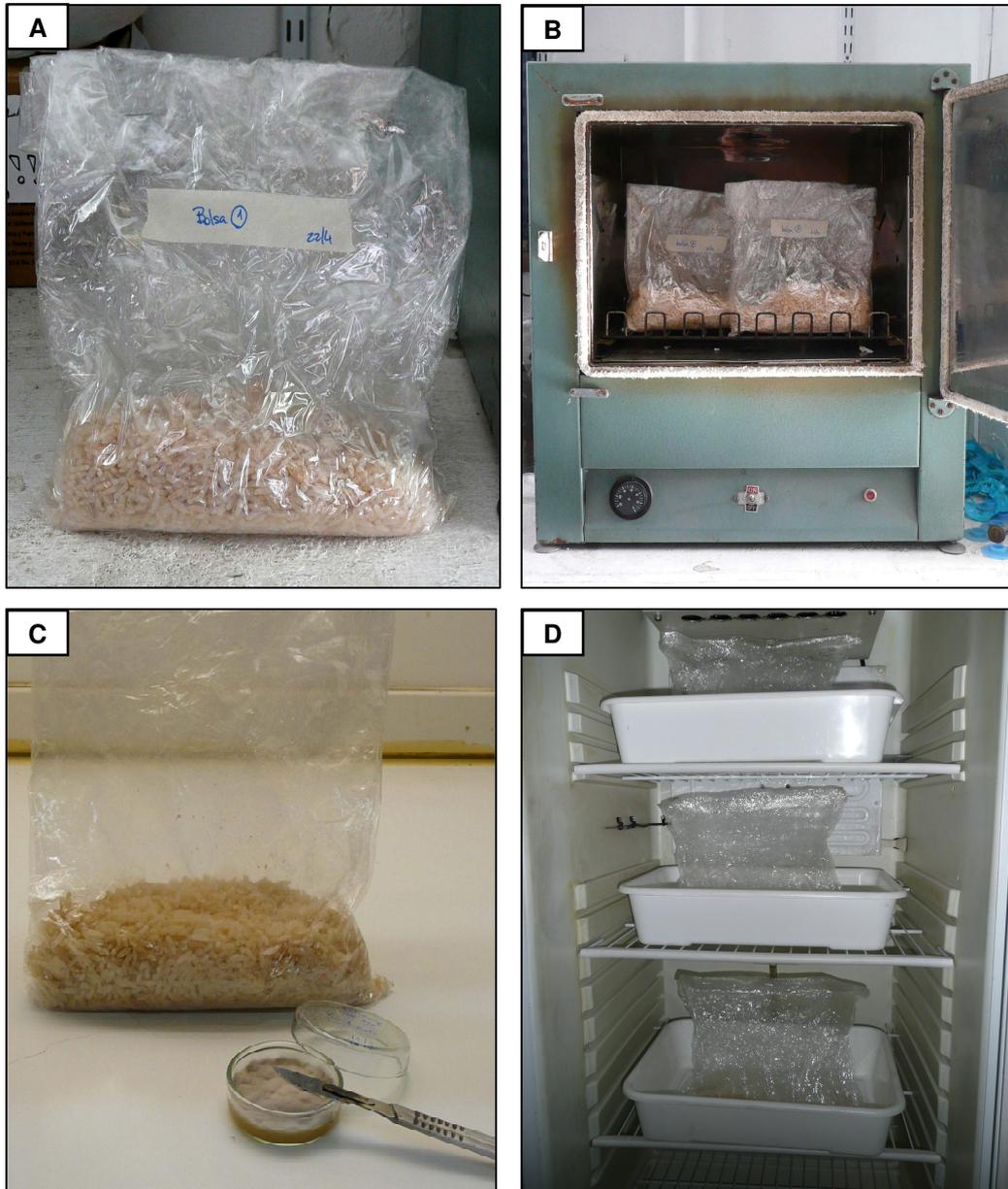


Figura 14: Etapas de la producción masiva del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*.

A: Bolsas de polipropileno conteniendo los granos de arroz parboil. **B:** Estufa donde se secaron los granos de arroz esterilizados. **C:** Inoculación del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* en granos de arroz parboil. **D:** Cámara incubadora donde las bolsas fueron conservadas a 25° C durante 15, 20, 25, 30 y 35 días para favorecer la multiplicación del hongo.

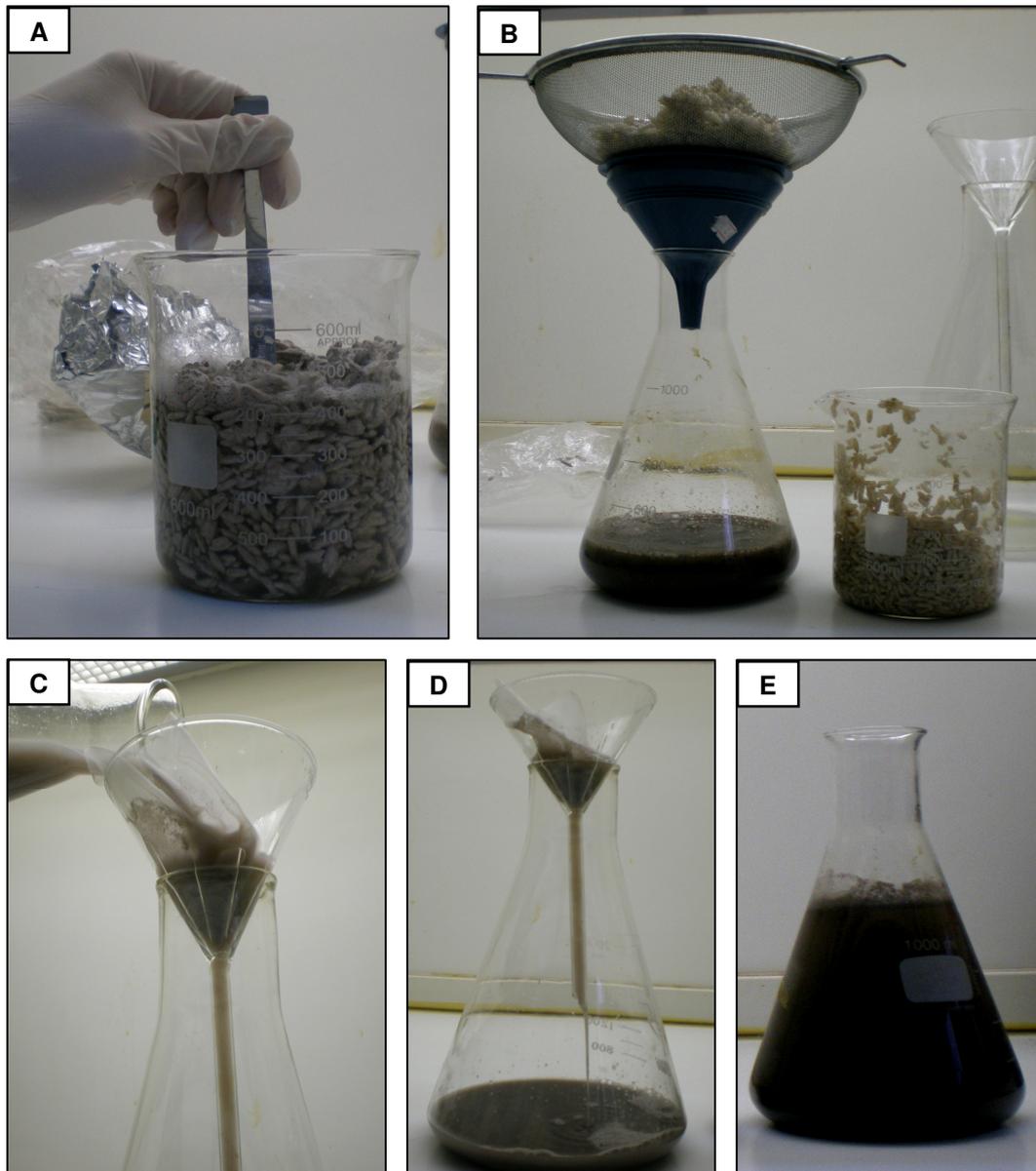


Figura 15: Procesamiento del sustrato de producción masiva y la elaboración de una suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) (S.C.P.M).

A: Lavado de los granos de arroz con Tween 80 0,01%. **B:** Filtrado del material líquido de los granos de arroz con un colador. **C y D:** Filtrado del material líquido con una tela de voile. **E:** Suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) proveniente del sustrato de producción masiva (S.C.P.M).

2.13.6. Susceptibilidad de los estados de desarrollo de *T. vaporariorum* a la S.C.P.M de *I. fumosorosea* (CEP 315)

En primera instancia, se sincronizó el ciclo de vida de *T. vaporariorum* en plantas de tomate situadas dentro de jaulas de madera en una cámara incubadora a 25° C con fotoperíodo 12hs luz y 12hs oscuridad (figura 8 B). Para ello se colocaron entre 50 a 100 adultos dentro de las jaulas y, luego de 48 hs, éstos fueron removidos con ayuda de un aspirador bucal. Al cabo de 2, 7, 12, 15, 18 y 22 días después de la remoción de los adultos se obtuvieron huevos, ninfas I, ninfas II, ninfas III, ninfas IV y adultos de *T. vaporariorum* respectivamente.

Una vez sincronizado el ciclo de vida de *T. vaporariorum* en condiciones de laboratorio, se cortaron hojas de tomate que contenían cada uno de los estados inmaduros y se cuantificó el número de individuos presentes por hoja. Los bioensayos consistieron en la aspersión de 400 µl de cada uno de los tratamientos en el envés de las hojas mediante la utilización de un aspersor de vidrio (figura 10). Los tratamientos realizados fueron los siguientes:

- Tween 80 0,01 % (v/v) (control)
- Suspensión de 1×10^7 conidios/ml del aislamiento CEP 315 proveniente de medio de cultivo SDYA agarizado (S.C.M.A).
- Suspensión de 1×10^7 conidios/ml del aislamiento CEP 315 proveniente de la producción masiva (S.C.P.M)

Luego de la pulverización, las hojas de tomate fueron colocadas en recipientes con agua destilada y cubiertas con bolsas de polipropileno (figura 10) para favorecer las condiciones elevadas de humedad. Todas las hojas fueron mantenidas durante 7 días en cámara incubadora a 25° C con fotoperíodo de 12hs luz y 12hs oscuridad. Los bioensayos fueron realizados con al menos 20 individuos por hoja y con tres replicas por tratamiento. Diariamente, se cuantificó el número de individuos que presentaban síntomas de infección fúngica y, al cabo de 7 días, se estimó el porcentaje de mortalidad promedio.

Los bioensayos con adultos de *T. vaporariorum* se llevaron a cabo en capsulas de Petri conteniendo una hoja de tomate o chaucha como fuente de alimento y 20 a 30 adultos por cápsula (figura 11). En cada cápsula se pulverizó 400 µl de cada uno de los tratamientos y, luego, fueron almacenadas durante 7 días en una cámara incubadora a 25° C con fotoperíodo de 12hs luz y 12hs oscuridad. Diariamente, se midió el número

de adultos muertos y con síntomas de infección fúngica y, al cabo de 7 días, se estimó el porcentaje de mortalidad promedio.

Los valores de porcentaje de mortalidad fueron transformados con la función arcoseno y analizados estadísticamente con el programa STATISTICA 7.0 (Stat Soft, Inc. 2007). Se realizó un test de Levene para comprobar la homogeneidad de las varianzas y, como se encontró heterocedasticidad, se realizó un test no paramétrico Mann – Whitney ($p < 0,05$) para verificar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (S.C.M.A y S.C.P.M). Luego, se llevo a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias significativas entre los estados de desarrollo para cada tratamiento. Las diferencias significativas fueron identificadas con un test de Tukey ($p < 0,05$) y representadas con letras diferentes. Además, se realizó un test ANOVA de dos vías para verificar si existe interacción entre los tratamientos (S.C.M.A y S.C.P.M) y los estados de desarrollo.

2.13.7. Estimación de la concentración letal 50 y 90 de la S.C.P.M

Con el fin de evaluar la concentración letal 50 (CL_{50}) y 90 (CL_{90}) de la suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (S.C.P.M), se prepararon 5 diluciones conteniendo 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios/ml. Cada una de estas diluciones fueron rociadas sobre el envés de hojas de tomate con ninfas del tercer estadio de *T. vaporariorum*. Luego de la aspersión, las hojas fueron colocadas con sus pecíolos dentro de frascos con agua destilada y cubiertas con bolsas de polipropileno. Todas las diluciones fueron evaluadas por triplicados y mantenidos durante 7 días en cámara incubadora a $25^\circ C$ con fotoperíodo de 12hs luz y 12hs oscuridad. Diariamente, se cuantificó el número de individuos con síntomas de infección micótica y al cabo de 7 días se estimó el porcentaje de mortalidad para cada concentración del aislamiento fúngico. Estos valores fueron relacionados mediante el programa Micro Probit (Sparks y Sparks, 1987) y se estimó la concentración letal con la cual se obtiene un 50 % y 90 % de individuos muertos (CL_{50} y CL_{90}).

2.14. Aplicación del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* en cultivos hortícolas

Una vez estimada la calidad de la S.C.P.M y su patogenicidad bajo condiciones de laboratorio, se evaluó la patogenicidad de la S.C.P.M de *I. fumosorosea* sobre poblaciones de “mosca blanca” presentes en cultivos hortícolas bajo cubierta.

La experiencia se realizó durante el mes de mayo del 2009 en la Estación Experimental Julio Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de UNLP, Los Hornos, La Plata (sitio de muestro número 11, tabla 2). En este lugar, se encontraron dos invernáculos: uno de ellos con techo parabólico y estructura metálica con nylon que contenía plantas de tomate variedad Elphida en etapa fenológica de 4ª corona (4 meses post-siembra) (figura 16 A y B), y otro invernáculo tipo capilla con estructura de madera y nylon que presentaba plantas de berenjena variedad Barcelona en etapas fonológica reproductiva (9 meses post-siembra) (figura 16 C y D). Las plantaciones de tomate y berenjena estaban fuertemente infestadas con “mosca blanca” (*B. tabaci* y *T. vaporariorum*) como así también, con “pulgonés” (Hemiptera: Aphididae) y “trips” (Insecta: Thysanoptera).

La aplicación a campo de la S.C.P.M de *I. fumosorosea* se llevó a cabo en parcelas de 10 plantas de cada especie vegetal, en las cuales se pulverizó dos concentraciones de S.C.P.M (1×10^7 y 1×10^8 conidios/ml) o Tween 80 0,01 % como control. La S.C.P.M obtenida en condiciones de esterilidad en el laboratorio, fue diluida con Tween 80 0,01 % para ajustar las dos concentraciones de conidios, las cuales fueron colocadas en bidones de plástico de 5 litros (figura 17 A) para ser transportadas hasta la quinta donde se realizó la experiencia. Una vez en el lugar, cada tratamiento fue transferido a un aspersor de plástico de 1 litro (figura 17 A) y se pulverizó en cada parcela alrededor de 2 ml por foliolo, dirigiendo la aplicación hacia el envés de las hojas de tomate o berenjena (figura 17 B). Luego, cada parcela fue cubierta con tela blanca para poder sectorizar las plantas tratadas de las no tratadas, como así también, para evitar la aplicación de algún agroquímico (figura 17 C). En las plantaciones de tomate las parcelas fueron distribuidas a lo largo del surco de siembra (figura 17 D), sin embargo, en las plantaciones de berenjenas las parcelas fueron distribuidas en tres surcos diferentes. Se consideró como unidad de muestreo a cada planta presente en la parcela (10 muestras por parcela).

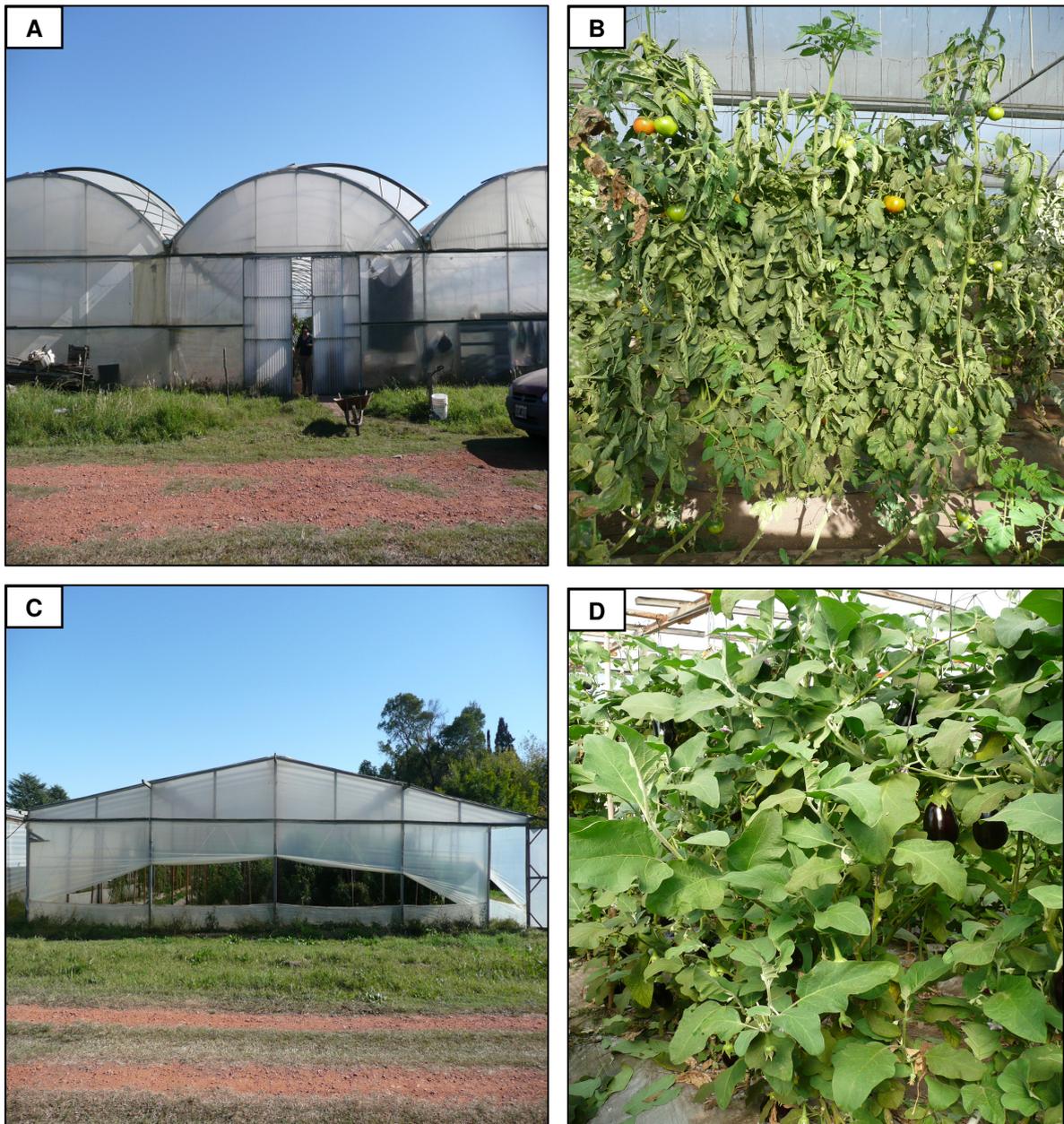


Figura 16: Plantaciones de tomate y berenjena ubicadas bajo cubierta en la Estación Experimental Julio Hirschhorn, La Plata (sitio 11).

A y B: Plantaciones de tomate variedad Elphida en etapa fenológica de 4^a corona ubicadas en un invernáculo con techo parabólico y con estructura metálica y nylon. C y D: Plantaciones de berenjena variedad Barcelona en etapa fenológica reproductiva final ubicadas dentro de un invernáculo tipo capilla con estructura de madera y nylon.



Figura 17: Aplicación de la S.C.P.M. de *I. fumosorosea* (CEP 315) en cultivos de tomate y berenjena bajo cubierta en la Estación Experimental Julio Hirschhorn, La Plata (sitio 11).

A: Suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) obtenida por producción masiva (S.C.P.M) en condiciones de laboratorio. **B:** Aplicación de la S.C.P.M en el envés de las hojas donde se encuentran los individuos de *T. vaporariorum*. **C:** Protección con tela blanca del grupo de plantas donde fue aplicado la S.C.P.M. **D:** Distribución de los grupos de plantas tratadas dentro del invernáculo.

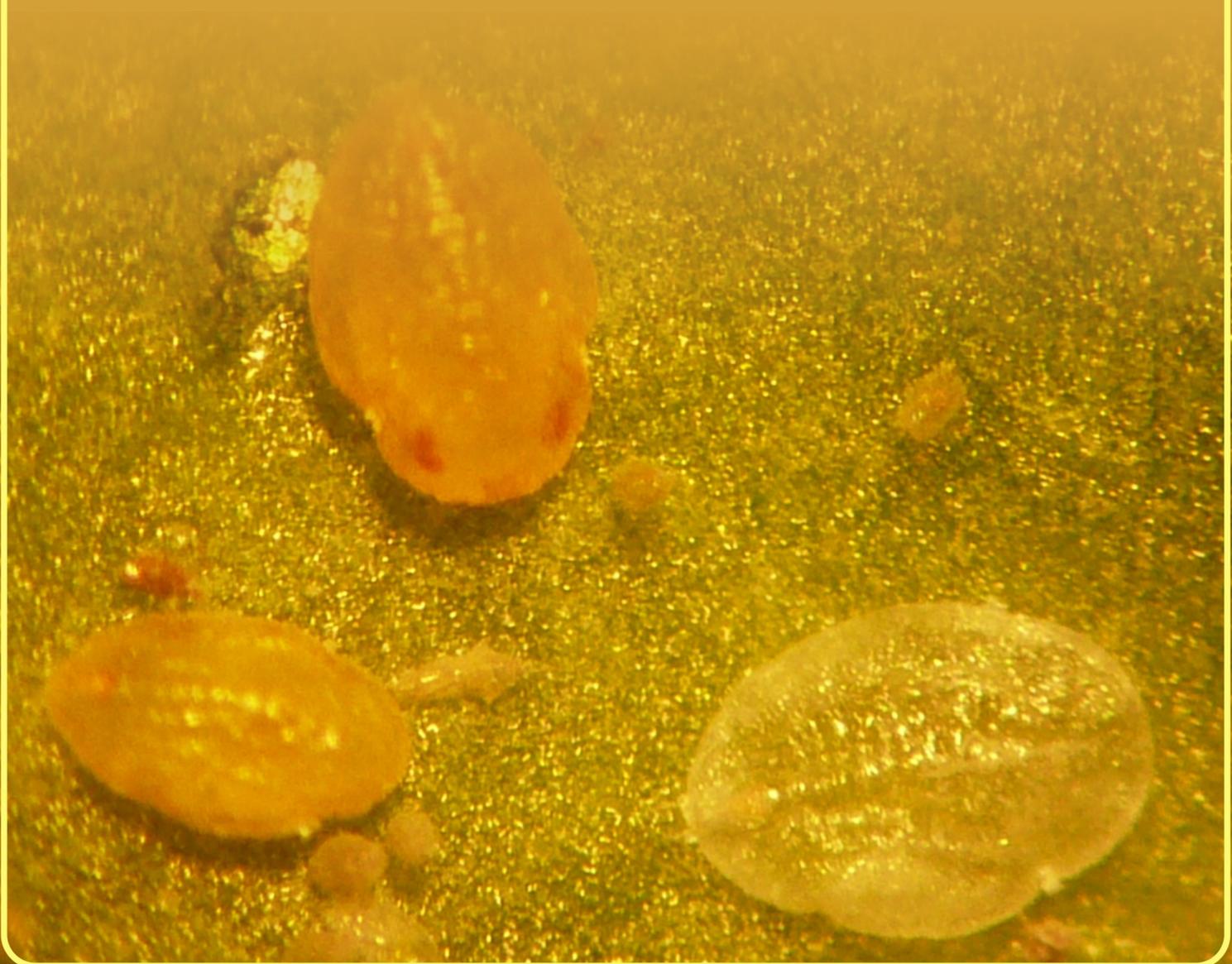
La población de individuos de “mosca blanca” sanos e infectados fue monitoreada antes y después de la aplicación con una frecuencia de tres veces por semana durante un mes. La densidad de adultos se estimó al cuantificar el número de adultos en el envés de dos folíolos del estrato superior de la planta (hoja 1 y hoja 2), y la densidad de ninfas mediante el recuento de los individuos presentes en dos folíolos del estrato medio e inferior (hoja 5 y 6) bajo microscopio binocular estereoscópico en el laboratorio. Los valores de densidad fueron referidos como número de individuos por

foliolo. Aquellos individuos que estaban muertos o presentaban síntomas de infección micótica fueron colocados dentro de cámaras húmedas (figura 5) para favorecer el desarrollo de estructuras fúngicas. Para confirmar la infección por *I. fumosorosea* (CEP 315) los individuos fueron observados en microscopio óptico con contraste de fases. En cada monitoreo, se cuantificó el número de individuos infectados en relación con el número total de individuos para estimar el porcentaje de infección. Los datos de temperatura media diaria y humedad relativa del interior de los invernáculos fueron obtenidos a partir del Boletín Agrometeorológico Mensual de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

2.15. Persistencia del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* en el suelo

Con el fin de evaluar la persistencia de los conidios de *I. fumosorosea* en las partículas del suelo, el material sobrante de la S.C.P.M de 1×10^8 conidios/ml se aplicó en un espacio reducido de suelo dentro de los invernáculos de estudio. Al cabo de 4, 15, 30, 40 y 60 días, como así también, 9 meses después de la inoculación del S.C.P.M en el suelo, se visitó cada uno de los invernáculos y se extrajo una porción del suelo a 3 cm de profundidad. De cada muestra se tomó un gramo de suelo y se diluyó con 4 ml de agua destilada estéril. Luego se agitó vigorosamente durante 1 minuto usando un agitador y se sembró 100 μ l de la dilución en un medio selectivo con Dodine (acetato de N-dodecilguanidinio) (Anexo). Todos los cultivos fueron incubados a 25° C en condiciones de oscuridad por 10 días para favorecer el desarrollo de estructuras fúngicas. Las colonias obtenidas fueron transferidas a medio de cultivo SDYA para permitir la esporulación del hongo y poder confirmar su identificación mediante observación microscópica de sus estructuras reproductivas.

3. RESULTADOS



Prospección y variación estacional de hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas

3.1.1. Relevamiento de individuos de “mosca blanca” y hongos entomopatógenos

Durante el período de muestreo (mayo de 2007 a mayo de 2009) se realizó el relevamiento de individuos de “mosca blanca” en diferentes regiones geográficas del país para la prospección de hongos entomopatógenos. Las áreas de estudio correspondieron a plantaciones hortícolas con producción orgánica o convencional, ubicadas nueve de ellas en la provincia de Buenos Aires (sitio 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13 y 14), dos en Misiones (sitio 5 y 6), dos en Neuquén (sitio 7 y 8) y una en Río Negro (sitio 9) (tabla 5). Los cultivos hortícolas examinados correspondieron a plantaciones de acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.), apio (*Apium graveolens* L.), arvejas (*Pisum sativum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), chaucha (*Phaseolus vulgaris* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y zapallito (*Cucurbita maxima* Duch.), los cuales se encontraron bajo cubierta (invernáculo) o “a cielo abierto” (campo) (tabla 5).

En la mayoría de los sitios de muestreo se observó que la “mosca blanca” (Hemiptera: Aleyrodidae) fue una de las plagas predominantes, junto con los “pulgonos” (Hemiptera: Aphididae) y los “trips” (Insecta: Thysanoptera). Otras plagas encontradas fueron las “polillas” (Lepidoptera: Gelechiidae), las “arañuelas” (Acari: Tetranychidae), los “minadores de hojas” (Diptera: Agromizidae) y las “orugas defoliadoras” (Lepidoptera: Noctuidae). Dentro del complejo de especies de “mosca blanca”, se observó que *Trialeurodes vaporariorum* fue la especie predominante, ya que se encontró en ocho áreas de muestreo (sitio 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12 y 13), mientras que *Bemisia tabaci* se encontró en 3 áreas de muestreo (sitio 3, 4 y 5) (tabla 5). Los individuos de *T. vaporariorum* fueron detectados mayoritariamente en plantaciones de tomate, chaucha, lechuga, apio, pepino y zapallo, y los individuos de *B. tabaci* en cultivos de morón y berenjena. En las áreas de muestreo presentes en la provincia de Misiones, Neuquén, Río Negro y Buenos Aires (Partido de Magdalena) (sitios 6, 7, 8, 9 y 14) no se observó la presencia de “mosca blanca”, lo cual se indica en la tabla 5 como “NE”.

Tabla 5: Sitios de muestreo con producción hortícola orgánica o convencional visitados durante los años 2007 a 2009.

Sitio de Muestreo	Ubicación	Coordenadas Geográficas	Plantaciones hortícolas	Especies de "mosca blanca"	Fecha del muestreo
PRODUCCION ORGÁNICA					
Sitio 1	Partido de La Plata, Buenos Aires	S 34° 59' W 57° 59'	tomate, zapallo ¹	<i>T. vaporariorum</i>	21/05/2007 01/11/2007
Sitio 2	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires	S 34° 56' 19'' W 58° 06' 4''	lechuga, tomate ¹	<i>T. vaporariorum</i>	20/03/2007 23/05/2007
Sitio 3	Abasto, Partido de La Plata, Buenos Aires	S 34° 56' 41.0'' W 58° 07' 56.7''	acelga, apio, berenjena, chaucha, lechuga, pimiento, pepino, tomate ¹	<i>T. vaporariorum</i> y <i>B. tabaci</i>	2007-2009
Sitio 6	Obera, Misiones	S 27° 29' W 58° 08'	acelga ²	NE	01/12/2007
Sitio 14	Partido de Magdalena, Buenos Aires	S 35° 08' W 57° 75'	berenjena, lechuga, acelga ²	NE	05/05/2009
PRODUCCION CONVENCIONAL					
Sitio 4	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires	S 34° 56' 30.1'' W 58° 04' 53.7''	acelga, apio, arvejas, berenjena, chaucha, lechuga, pepino, pimiento, tomate, zapallo ¹	<i>T. vaporariorum</i> y <i>B. tabaci</i>	2007-2009
Sitio 5	Posadas, Misiones	S 27° 23' W 55° 54'	lechuga, pimiento, tomate ¹	<i>B. tabaci</i>	28/11/2007
Sitio 7	Senillosa, Neuquén	S 39° 01' 03.8'' W 68° 27' 49.4''	tomate ²	NE	27/12/2007
Sitio 8	Senillosa, Neuquén	S 39° 01' 34.0'' W 68° 27' 35.2''	tomate ²	NE	27/12/2007
Sitio 9	Roca, Río Negro	S 39° 02' 59.2'' W 67° 36' 38.5''	tomate ²	NE	27/12/2007
Sitio 10	Los Hornos, Partido de La Plata, Buenos Aires	S 34° 59' 9.0'' W 57° 59' 51.5''	berenjena, lechuga, pimiento, tomate ¹	<i>T. vaporariorum</i> y <i>B. tabaci</i>	18/06/2008
Sitio 11	Mar del Plata, Buenos Aires	S 38° 02' 31.3'' W 57° 39' 11.0''	tomate ¹	<i>T. vaporariorum</i>	14/11/2008
Sitio 12	Mar del Plata, Buenos Aires	S 38° 02' 34.4'' W 57° 39' 15.7''	berenjena, chaucha, pepino, pimiento, tomate ¹	<i>T. vaporariorum</i>	14/11/2008
Sitio 13	Mar del Plata, Buenos Aires	S 38° 01' 54.3'' W 57° 40' 15.1''	chaucha, lechuga, tomate ¹	<i>T. vaporariorum</i>	14/11/2008

¹ Plantaciones hortícolas desarrolladas bajo cubierta (invernáculo).

² Plantaciones hortícolas ubicadas a "cielo abierto" (campo).

NE: material no encontrado durante los muestreos.

3.1.2. Monitoreo de las poblaciones de “mosca blanca” en cultivos hortícolas

Con el objetivo de estudiar la dinámica poblacional de los individuos de “mosca blanca” y así poder optimizar la prospección de hongos entomopatógenos, se realizó un monitoreo semanal durante los meses de octubre del 2007 a mayo del 2009 en plantaciones de tomate, chaucha, berenjena, pepino y zapallitos con producción orgánica y convencional. Las áreas de estudio fueron seleccionadas por su proximidad a la ciudad de La Plata y correspondieron a establecimientos con producción orgánica (sitio 3) o producción convencional (sitio 4) (tabla 5).

Durante el período de octubre de 2007 a junio de 2008, se enfatizaron los monitoreos en las plantaciones de tomate, por ser uno de los cultivos de mayor producción en el Cinturón Hortícola de La Plata (Balcaza, 2006; Martínez Quintana y Balcaza, 2008). En primera instancia se determinó la distribución de los individuos de “mosca blanca” dentro de las plantaciones de tomate bajo cubierta. Para ello se monitoreó la densidad de adultos y ninfas (número de individuos/foliolo) presentes en plantas ubicadas en el centro o en los laterales del invernáculo. Tanto los adultos como las ninfas se ubicaron mayoritariamente en los laterales del invernáculo (figura 18), los cuales corresponde a los sitios de entrada de estos insectos.

La dinámica poblacional de los individuos de “mosca blanca” en cultivos de tomate redondo (variedades Grifi, Superman y Badro) y “cherry” (variedad Colly y Miguel Angel) fue evaluada durante dos ciclos de producción consecutivos. El primer ciclo de tomate correspondió a los meses de septiembre de 2007 a enero de 2008 y el segundo ciclo desde febrero de 2008 a junio de 2008. En las plantaciones con producción orgánica se observó que las poblaciones de “mosca blanca” fueron aumentando a medida que se alcanzaba la estación de verano, obteniendo el máximo de densidad en los meses de enero y febrero del 2008 (16,8 adultos/foliolo y 194,5 ninfas/foliolo) (figura 19). En las plantaciones con producción convencional, se observó grandes fluctuaciones en la densidad de individuos de “mosca blanca” ocasionadas por la aplicación de productos fitosanitarios (fungicidas e insecticidas), sin embargo, se observó una tendencia a aumentar hacia los meses de verano alcanzando valores de 59 adultos/foliolos y 96,1 ninfas/foliolo (figura 20). Cabe destacar que las poblaciones de “mosca blanca” fueron mayores en las plantaciones de tomate con producción convencional, indicando que el método químico utilizado no fue el apropiado para controlar las poblaciones de “mosca blanca”.

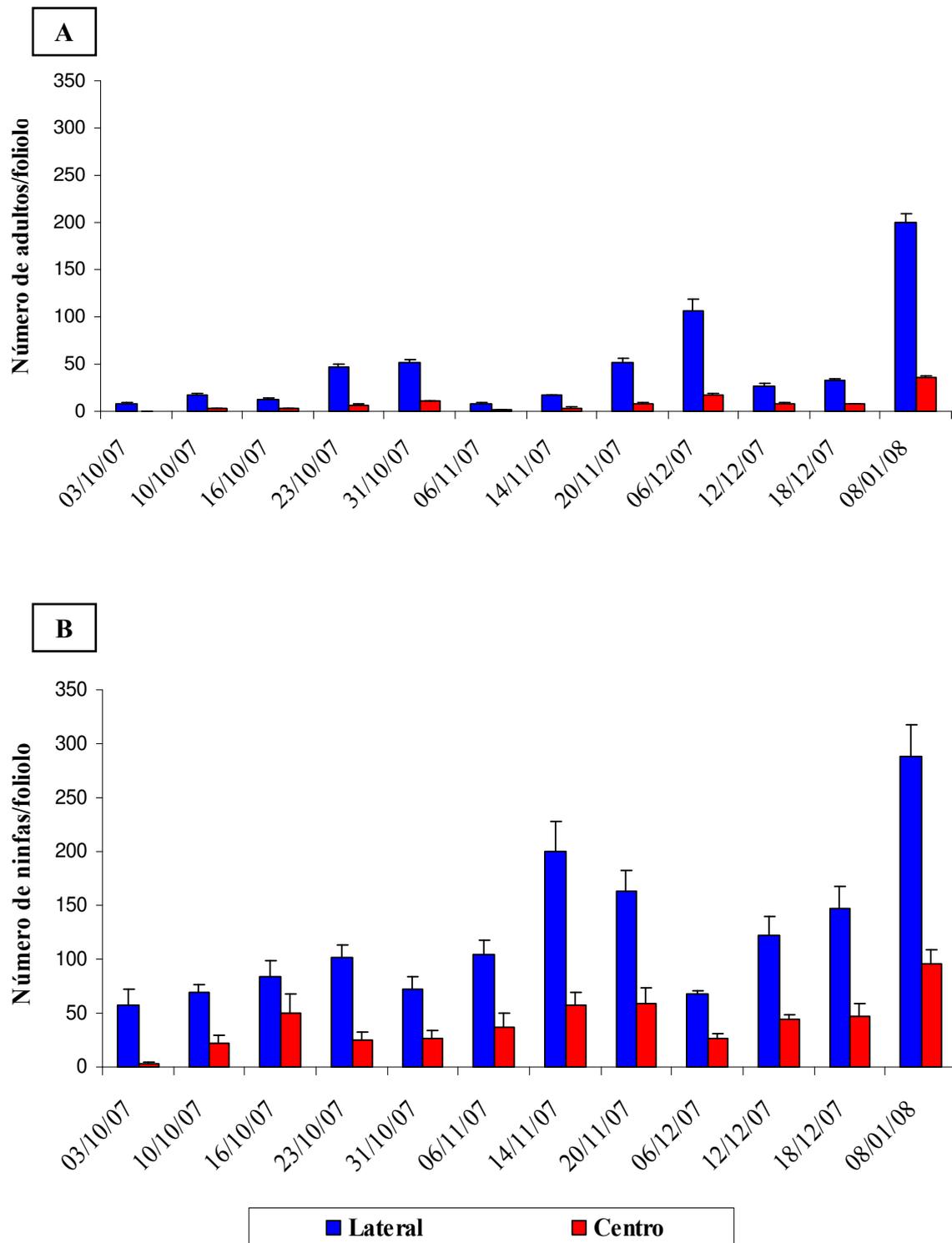


Figura 18: Densidad de adultos y ninfas de “mosca blanca” dentro del invernáculo.

Se cuantificó la densidad de adultos y ninfas presentes en plantas de tomate ubicadas en los laterales o en el centro del invernáculo. La densidad se estimó como el número de individuos/foliolo. **A:** densidad de adultos. **B:** densidad de ninfas.

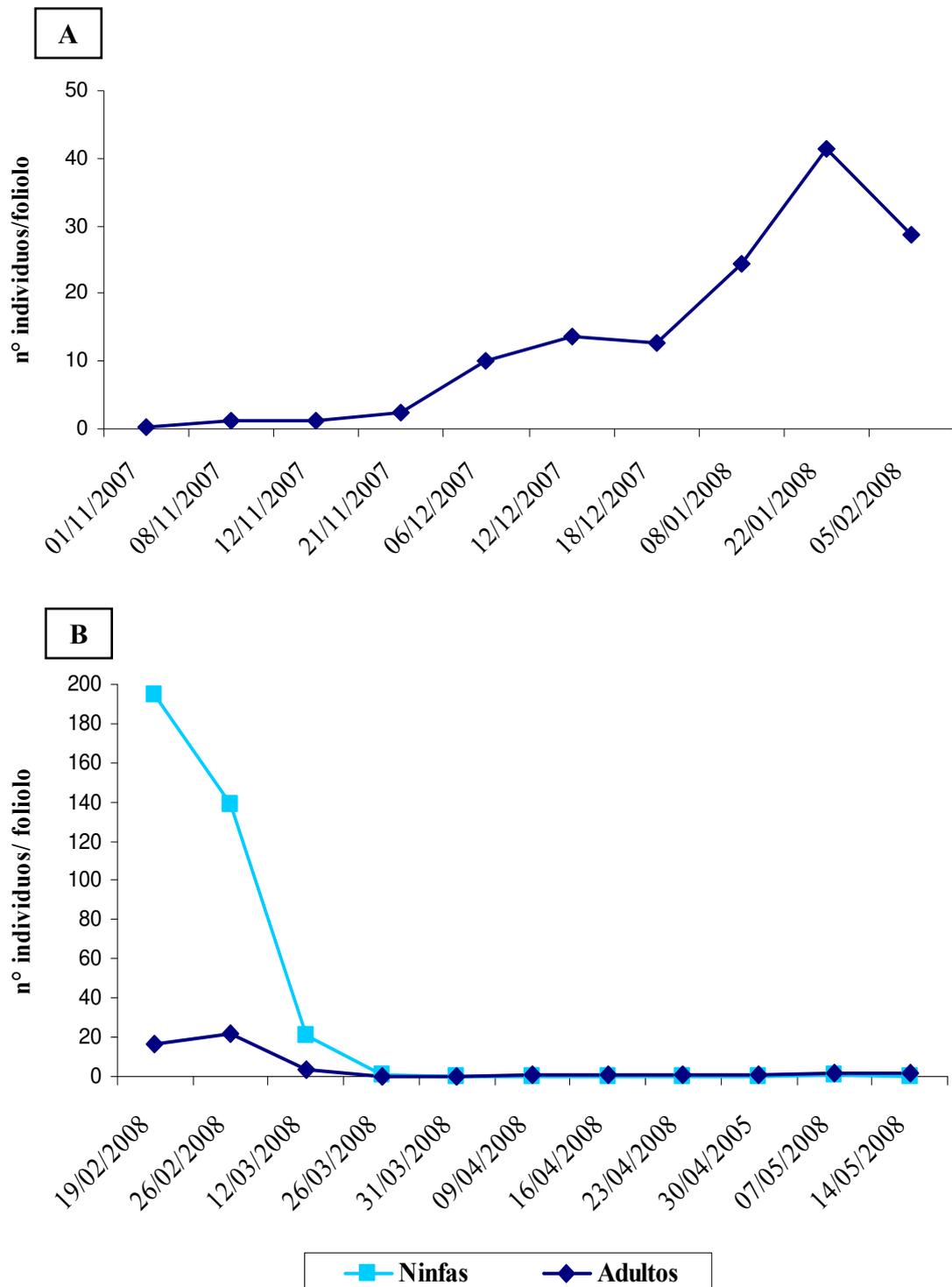


Figura 19: Variación estacional de la densidad de individuos de “mosca blanca” en plantaciones de tomate con producción orgánica (sitio 3) durante octubre de 2007 a junio de 2008.

Se monitoreó semanalmente el número de adultos y ninfas en 2 plantaciones de tomate ubicadas bajo cubierta en el sitio 3. Se estimó la densidad promedio como el número de individuos por foliolo. Durante el primer ciclo de tomate no se representan los valores del número de ninfas debido a la escasa información recolectada. **A:** primer ciclo de tomate (octubre de 2007 a enero de 2008). **B:** segundo ciclo de tomate (febrero a junio 2008).

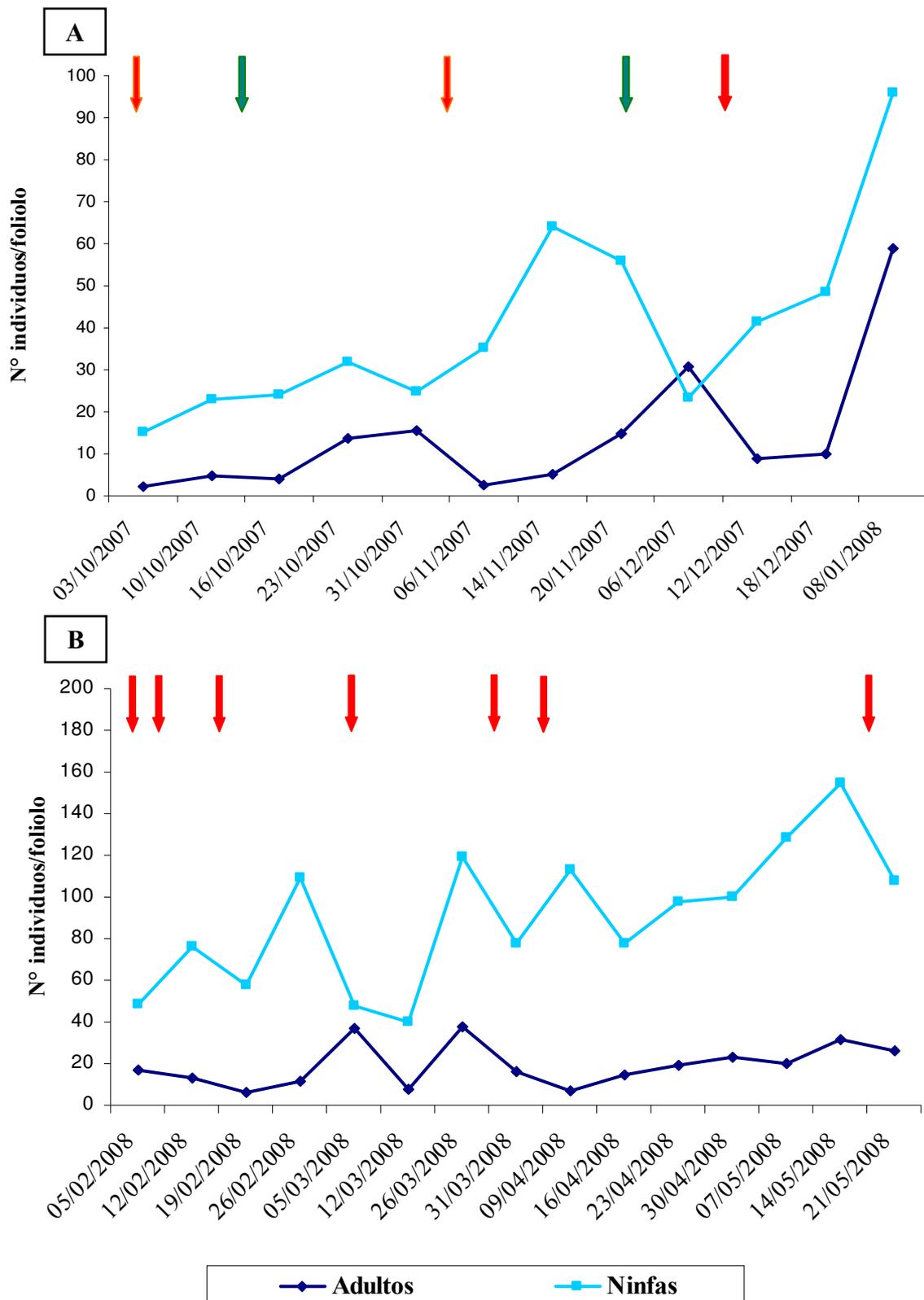


Figura 20: Variación estacional de la densidad de individuos de “mosca blanca” en plantaciones de tomate con producción convencional (sitio 4) durante octubre de 2007 a junio de 2008.

Se monitoreó semanalmente el número de adultos y ninfas en 4 plantaciones de tomate ubicadas bajo cubierta en el sitio 4. Se estimó la densidad promedio como el número de individuos por foliolo. Flecha verde: aplicación de fungicidas. Flecha roja: aplicación de insecticidas. **A:** primer ciclo de tomate (octubre de 2007 a enero de 2008). **B:** segundo ciclo de tomate (febrero a junio 2008).

Al comparar la densidad de adultos y ninfas de “mosca blanca” en las plantaciones de tomate, se observó que el número de ninfas por foliolo fue mayor al de adultos tanto en la producción orgánica como en la producción convencional. Esto se relacionaría con los parámetros de fecundidad de las hembras, ya que una hembra puede depositar entre 150 a 300 huevos (Saini y Alvarado, 2006). Así mismo, al analizar la variación temporal de los diferentes estados de desarrollo, se observó que el aumento de ninfas ocurría alrededor de 15 días después de un aumento en el número de adultos (figura 20).

En el período de muestreo que abarcó los meses de agosto a diciembre de 2008 se realizaron monitoreos de las poblaciones de “mosca blanca” presentes en cultivos de tomate, chaucha, berenjena, pepino y zapallitos con producción orgánica y convencional. En el establecimiento con producción orgánica (sitio 3) se observó que en todos los cultivos hortícolas las poblaciones de “mosca blanca” se mantuvieron con valores cercanos a 1 adulto/foliolo durante los meses de agosto a noviembre del 2008 y luego fueron aumentando progresivamente hacia los meses de verano alcanzando valores de 13,5 adultos/foliolos en pepino, 7,4 adultos/foliolo en tomate, 4 adultos/foliolos en berenjena y 1,9 adultos/foliolos en chauchas (figura 21). En el establecimiento con producción convencional (sitio 4), se observó que las poblaciones de “mosca blanca” variaron ampliamente durante los meses de monitoreo, lo cual pudo deberse a la aplicación de insecticidas y fungicidas. Los valores máximos de densidad alcanzados en los cultivos hortícolas fueron de 19,8 adultos/foliolo en berenjena, 15,8 adultos/foliolo en zapallitos, 9,9 adultos/foliolo en chaucha y 5,4 adultos/foliolo en tomate (figura 21). Cabe destacar que los valores de densidad de “mosca blanca” obtenidos durante el monitoreo de agosto a diciembre del 2008 fueron menores a los valores alcanzados en plantaciones de tomate durante el monitoreo de 2007 (figura 19, 20 y 21), lo cual podría deberse a las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, precipitaciones, etc.) o a los factores propios del cultivo hortícola, tales como incidencia de plagas, presencia de enemigos naturales, rotación de los cultivos aledaños, etc.

En función de los resultados obtenidos hasta el momento, se puede inferir que las poblaciones de “mosca blanca” se encuentran presentes durante todo el año en las plantaciones de tomate, chaucha, berenjena, pepino y zapallito ubicadas bajo cubierta, alcanzando su máxima densidad en los meses de verano donde las temperaturas son elevadas (rango promedio de 20 a 30 °C fuera del invernáculo).

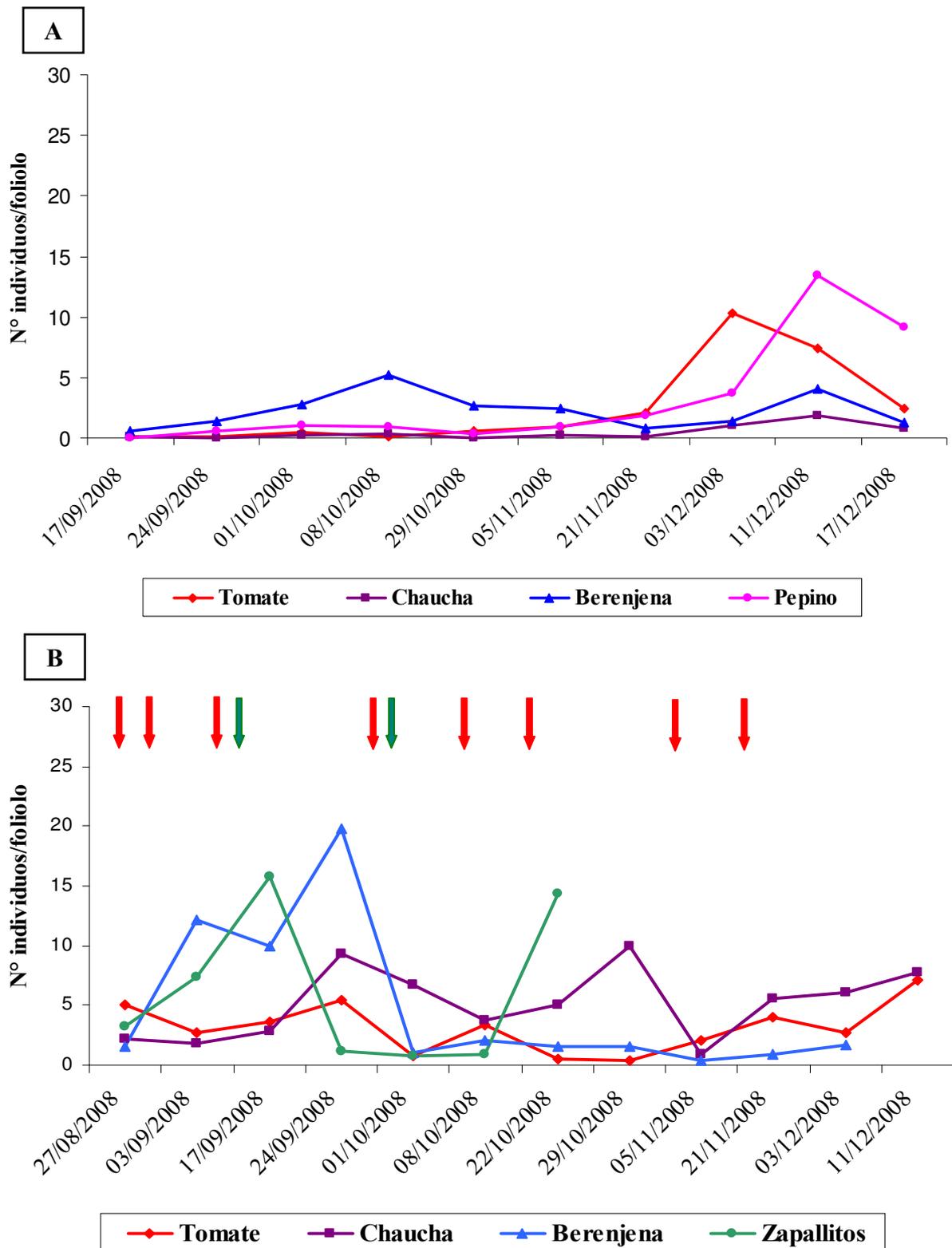


Figura 21: Variación estacional de la densidad de individuos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas orgánicos o convencionales durante agosto a diciembre de 2008.

Se monitoreó semanalmente el número de individuos de “mosca blanca” en 4 cultivos hortícolas ubicados bajo cubierta en establecimientos con producción orgánica (A) o convencional (B). Se estimó la densidad promedio como el número de individuos por foliolo. Flecha verde: aplicación de fungicidas. Flecha roja: aplicación de insecticidas.

3.1.3. Prospección de hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas orgánicos y convencionales

Como resultado de dos años de relevamiento de individuos de “mosca blanca” en la provincia de Buenos Aires, Neuquén, Río Negro y Misiones (tabla 5), se observó la presencia de infecciones fúngicas sólo en la provincia de Buenos Aires durante los meses de mayo, junio y octubre del 2007. Se recolectaron adultos de *T. vaporariorum* infectados con *I. fumosorosea* (Wize) Brown & Smith (Ascomycota: Hypocreales) en plantaciones de apio, chaucha, acelga, berenjena y tomate ubicados bajo cubierta en el establecimiento de Abasto (sitio 3) y en el establecimiento de Colonia Urquiza (sitio 4), Partido de La Plata, provincia de Buenos Aires (tabla 6).

En el establecimiento 3, con producción hortícola orgánica, se recolectaron adultos de *T. vaporariorum* con infección fúngica localizados en plantaciones de apio durante el muestreo del 4 de junio del 2007 (tabla 6). Estos adultos fueron procesados para obtener el aislamiento CEP 303 de *I. fumosorosea*.

En el establecimiento 4, con producción hortícola convencional, se recolectó abundante cantidad de adultos de *T. vaporariorum* con infección micótica (tabla 6). Durante los meses de mayo y junio de 2007, se observó una epizootia de *I. fumosorosea* en plantaciones de chaucha (figura 22). A partir de esta infección masiva se obtuvieron 6 aislamientos fúngicos (CEP 302, 308, 312, 314, 315 y 316). En el mismo establecimiento, los días 6 y 13 de junio del 2007, se recolectaron adultos infectados a partir de plantaciones de acelga y berenjena, respectivamente, consiguiéndose los aislamientos fúngicos CEP 309, 310, 311 y 313. Luego de la época invernal, se observó una nueva infección de adultos de *T. vaporariorum* en plantaciones de tomate durante los días 3, 10 y 16 de octubre (figura 23), lo que originó los aislamientos CEP 304, 305, 306 y 307.

Se debe destacar que la mayoría de los individuos de *T. vaporariorum* con infección fúngica fueron encontrados en el establecimiento con producción convencional (sitio 4). En este sitio se aplicaron insecticidas nicotinoides como Acetamiprid (nombre comercial Mospilan) e Imidacloprid (Confidor), insecticidas de la familia de los piretroide como Cialotrina (Karate) y piridazinonas como Pyridaben (nombre comercial SanMite). Además, se realizó la pulverización con el fungicida Procimidona (Sumilex). Este resultado indicaría que la aplicación de dichos productos fitosanitarios no afectó la incidencia natural de *I. fumosorosea*.

Tabla 6: Prospección de hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas con producción orgánica o convencional.

Tipo de producción	Sitio de Muestreo	Ubicación	Fecha del muestreo	Temperatura media*	Humedad relativa*	Cultivos hortícolas ⁺	Especie de "Mosca blanca"	Hongos patógeno
Orgánica	Sitio 3	Abasto, Partido de La Plata, Buenos Aires	04/06/2007	10,7°C	60%	Apio	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	<i>Isaria fumosorosea</i>
Convencional	Sitio 4	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires	22/05/2007	10,1°C	77%	Chaucha	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	<i>Isaria fumosorosea</i>
			04/06/2007	10,7°C	60%			
			13/06/2007	10,9°C	89%			
			06/06/2007	8,6°C	79%	Acelga	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	<i>Isaria fumosorosea</i>
			13/06/2007	10,9°C	89%	Berenjena	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	<i>Isaria fumosorosea</i>
			03/10/2007	18,2°C	86%	Tomate	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	<i>Isaria fumosorosea</i>
10/10/2007	14,4°C	83%						
16/10/2007	17,7°C	82%						

* Los valores de temperatura media del aire (°C) y de la humedad relativa (%) fueron obtenidos a partir del Boletín Agrometeorológico Mensual de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

⁺ Plantaciones hortícolas ubicadas bajo cubierta (invernáculo).

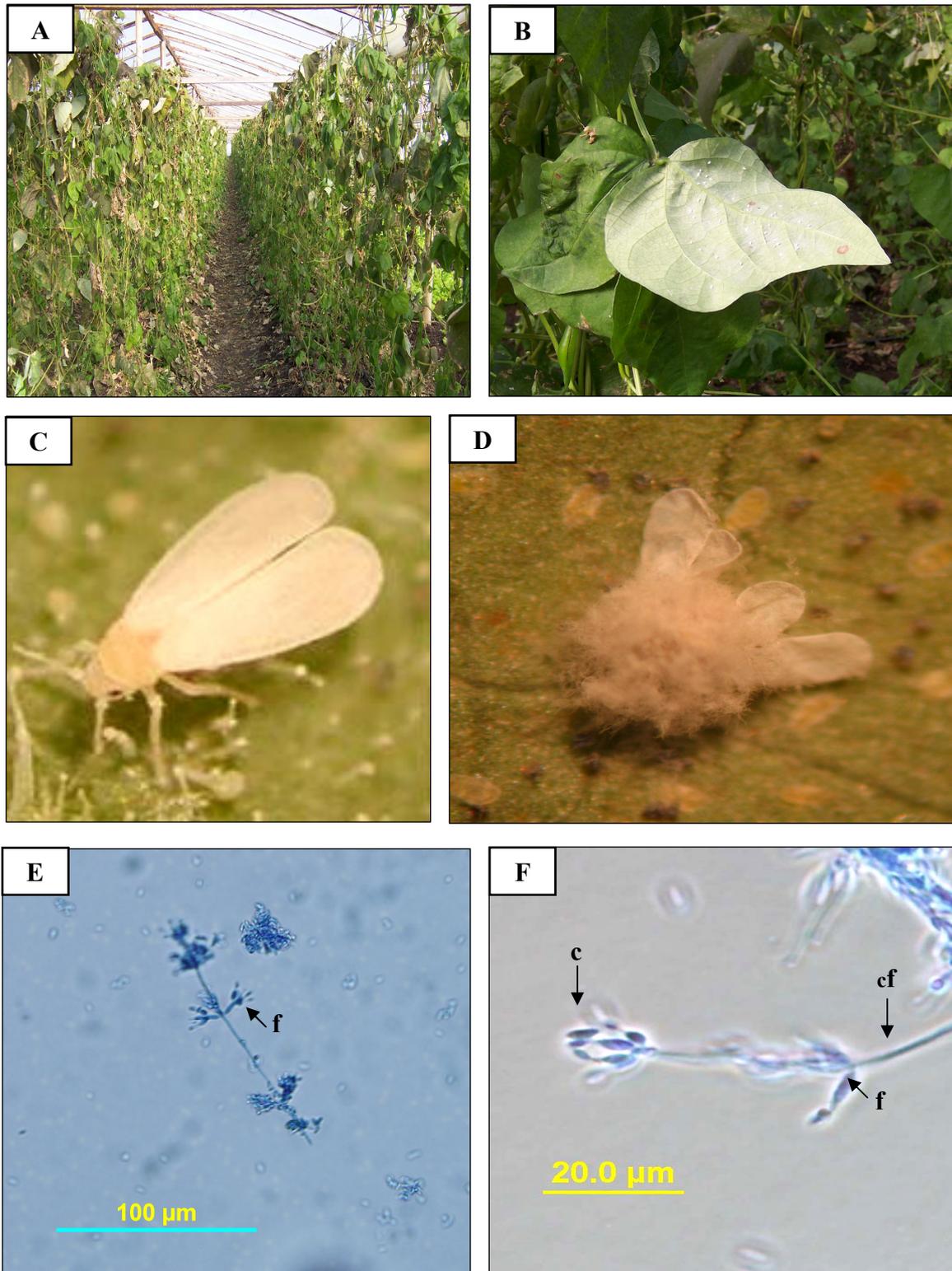


Figura 22: Adulto de *T. vaporariorum* infectado con *Isaria fumosorosea* en plantaciones de chaucha ubicadas en Colonia Urquiza, partido de La Plata, Buenos Aires (sitio 4).

A: Cultivo de chaucha bajo cubierta con manejo convencional. **B:** Adultos infectados sobre su planta hospedera. **C:** Adulto de *T. vaporariorum* sano. **D:** Adulto de *T. vaporariorum* infectado. **E y F:** Preparados microscópicos de las estructuras fúngicas de *I. fumosorosea* en azul de algodón-lactofenol Amann (0,01 p/v). Conidioforos (cf), fiálides (f) y conidios (c).

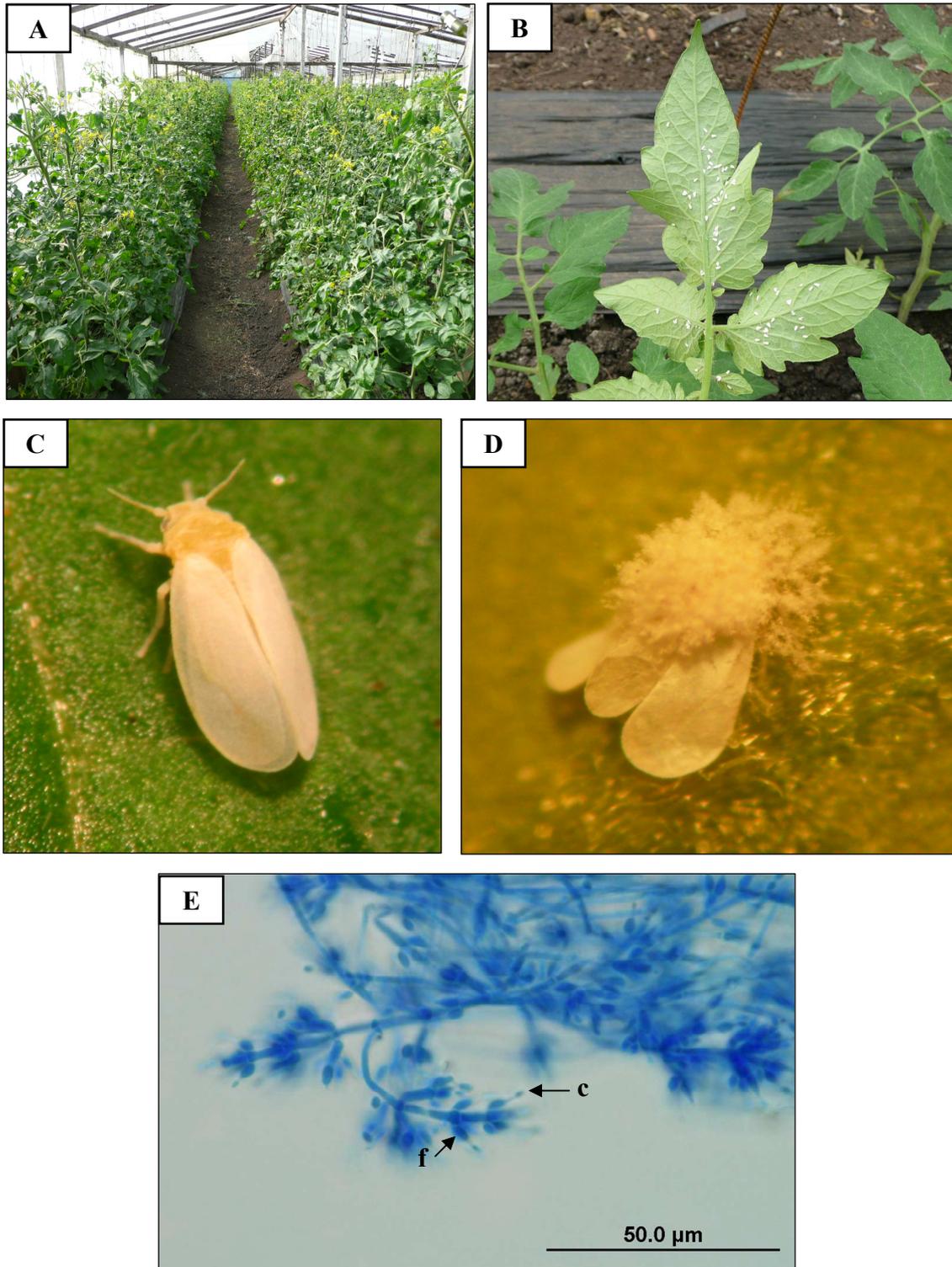


Figura 23: Adulto de *T. vaporariorum* infectado con *Isaria fumosorosea* en plantaciones de tomate ubicadas en Colonia Urquiza, partido de La Plata, Buenos Aires (sitio 4).

A: Cultivo de tomate bajo invernáculo. B: Adultos infectados sobre su planta hospedera. C: Adulto de *T. vaporariorum* sano. D: Adulto de *T. vaporariorum* infectado. E: Preparado microscópico de las estructuras fúngicas de *I. fumosorosea* en azul de algodón-lactofenol Amann (0,01 p/v). Conidioforos (cf), fiálides (f) y conidios (c).

3.1.4. Variación estacional y prevalencia de hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas

En función de los resultados expuestos hasta el momento, se puede deducir que la presencia de hongos patógenos de “mosca blanca” se registró sólo en los meses de mayo, junio y octubre del 2007, lo cual limitó el análisis de la variación estacional y prevalencia de éstos patógenos.

El monitoreo detallado para la búsqueda de individuos de “mosca blanca” con infecciones fúngicas se llevó a cabo desde septiembre de 2007 a mayo del 2009 en plantaciones de tomate, chaucha, berenjena, pepino y zapallitos ubicadas en los establecimientos 3 y 4 del partido de La Plata, provincia de Buenos Aires. Sin embargo, durante este período de muestreo sólo se registró la presencia de 4 adultos de *T. vaporariorum* infectados con *I. fumosorosea* en las plantaciones de tomate ubicadas en el establecimiento 4 (figura 24). Estos monitoreos registraron un porcentaje de infección de 4%, 0,9 y 0,7% para los días 3, 10 y 16 de octubre, respectivamente (tabla 7). En las muestras subsiguientes no se registró ningún individuo de “mosca blanca” con infección fúngica, por lo que no se muestran los resultados del relevamiento. Esta ausencia de hongos entomopatógenos durante el año 2008 y principios del 2009, podría deberse a la disminución de las poblaciones de “mosca blanca” en los cultivos hortícolas (figura 19, 20 y 21), como así también, a las condiciones ambientales que fueron más secas durante éste período de muestreo (la intensidad de las precipitaciones anuales promedio disminuyó de 127,8 mm en el 2007 a 55,6 mm en el 2008, y la humedad relativa promedio fue de 72 % en el 2007 y 61 % en el 2008).

Hay que destacar que previo a estos monitoreos (mayo y junio de 2007), se observó una epizootia de *I. fumosorosea* en plantaciones de chaucha del establecimiento 4 (figura 22), pero como fue un monitoreo preliminar de este trabajo de investigación no se registraron los valores de individuos de “mosca blanca” y por lo tanto, no se pudo estimar la prevalencia. Lo mismo sucedió para las plantaciones de apio, acelga y berenjena donde se recolectaron adultos infectados al realizar un monitoreo preliminar de los cultivos hortícolas.

Tabla 7: Recolección de adultos de *T. vaporariorum* infectados con *I. fumosorosea* en plantaciones de tomate del establecimiento 4 durante los meses de septiembre a diciembre de 2007.

Fecha	Temperatura media (°C)*	Humedad relativa (%)*	N° Total Adultos sanos	N° Total Adultos infectados	Porcentaje de infección (%) ⁺
04/09/2007	18,7	75	67	0	0,0%
12/09/2007	13,5	96	251	0	0,0%
19/09/2007	11,4	79	358	0	0,0%
26/09/2007	10,7	71	200	0	0,0%
03/10/2007	18,2	86	48	2	4,0%
10/10/2007	14,4	83	109	1	0,9%
16/10/2007	17,7	82	152	1	0,7%
23/10/2007	20,3	62	646	0	0,0%
31/10/2007	17,6	90	904	0	0,0%
06/11/2007	19,5	56	150	0	0,0%
14/11/2007	10,5	67	262	0	0,0%
20/11/2007	17,3	61	401	0	0,0%
06/12/2007	20,4	52	1234	0	0,0%
12/12/2007	21,7	49	973	0	0,0%
18/12/2007	20,2	56	648	0	0,0%

* Los valores de Temperatura media del aire (°C) y de la humedad relativa (%) fueron obtenidos a partir del Boletín Agrometeorológico Mensual de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

⁺ Porcentaje de infección estimado como el número de adultos infectados en relación al número total de adultos.

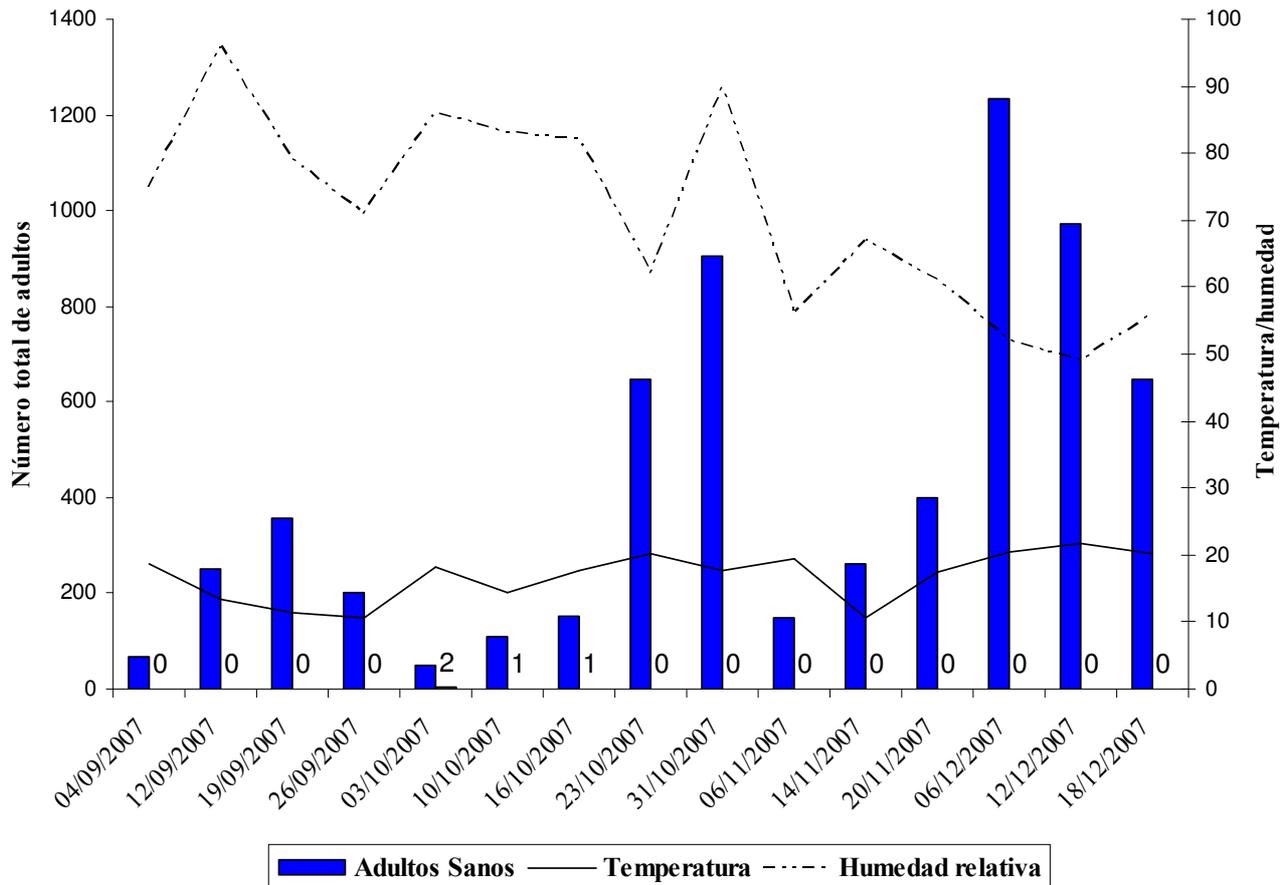


Figura 24: Número de adultos de *T. vaporariorum* sanos e infectados con *I. fumosorosea* en plantaciones de tomate del establecimiento 4.

Se monitoreó semanalmente el número de adultos de *T. vaporariorum* sanos e infectados en plantaciones de tomate con producción convencional. Los valores de temperatura (°C) y humedad relativa (%) fueron obtenidos a partir del Boletín Agrometeorológico Mensual de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Los números en el eje de las abscisas indican la cantidad de adultos infectados en cada día de muestreo.

Aislamiento, caracterización e identificación de los hongos patógenos de “mosca blanca”

3.2.1. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos a partir de individuos de “mosca blanca” infectados

Como resultado de la prospección de hongos patógenos de “mosca blanca”, se recolectaron adultos de *T. vaporariorum* con infección fúngica situados en plantaciones de chaucha (*Phaseolus vulgaris* L), apio (*Apium graveolens* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), acelga (*Beta vulgaris* var. cicla L.) y berenjena (*Solanum melongena* L.) en dos establecimientos del partido de La Plata, provincia de Buenos Aires (sitio 3 y 4) (tabla 6). A partir de estos adultos infectados se obtuvieron 15 aislamientos fúngicos identificados como *I. fumosorosea* (Wize) Brown & Smith, los cuales fueron preservados en la colección de hongos entomopatógenos del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), La Plata, Argentina; en la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA Soja), Londrina, Brasil; y en la colección de ARSEF, Ithaca, EE.UU (tabla 8).

El hongo entomopatógeno *I. fumosorosea* (Wize) Brown & Smith fue denominado antiguamente por Samson (1974) como *Paecilomyces fumosoroseus*, sin embargo, luego de una revisión taxonómica el genero se redefinió como *Isaria* (Hodge *et al.*, 2005 y Gams *et al.*, 2005). La estudios filogenéticos ubicaron a éste hongo entomopatógeno dentro del Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales, Familia Cordycipitaceae (Luangsa-ard *et al.*, 2005 y Sung *et al.*, 2007).

Tabla 8: Descripción de los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de adultos de *T. vaporariorum* en cultivos hortícolas convencionales y orgánicos

Colección CEPAVE ^a	Colección ARSEF ^b	Colección EMBRAPA ^c	Hongo identificado	Insecto Hospedador	Planta Sustrato	Localidad/Provincia	Fecha de muestreo
CEP 302	8716	CNPSO-585	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Chaucha	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	22/05/2007
CEP 303	8717	CNPSO-563	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Apio	Abasto, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 3)	04/06/2007
CEP 304	8718	CNPSO-570	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Tomate	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	03/10/2007
CEP 305	8719	CNPSO-564	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Tomate	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	03/10/2007
CEP 306	8720	CNPSO-580	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Tomate	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	10/10/2007
CEP 307	8721	CNPSO-567	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Tomate	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	16/10/2007
CEP 308	8723	CNPSO-568	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Chaucha	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	04/06/2007
CEP 309	8724	CNPSO-581	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Acelga	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	06/06/2007
CEP 310	8725	CNPSO-566	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Acelga	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	06/06/2007
CEP 311	8726	CNPSO-571	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Acelga	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	06/06/2007
CEP 312	8727	CNPSO-574	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Chaucha	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	13/06/2007
CEP 313	8728	CNPSO-569	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Berenjena	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	13/06/2007
CEP 314	8729	CNPSO-573	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Chaucha	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	22/05/2007
CEP 315	8730	CNPSO-584	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Chaucha	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	22/05/2007
CEP 316	8928	CNPSO-562	<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i>	Chaucha	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	22/05/2007

^a Número de referencia para la colección del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CCT-La Plata-UNLP), La Plata, Argentina.

^b Número de acceso de la colección de USDA-ARS, Plant Protection Research Unit, US Plant, Soil & Nutrition Laboratory (ARSEF), Ithaca, Nueva York., EE.UU.

^c Número de acceso de la colección de Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa Soja (EMBRAPA Soja), Londrina, Brasil.

3.2.2. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos a partir de muestra de suelo

Se recolectaron 30 muestras de suelo a partir de plantaciones de apio, acelga, berenjena, chaucha, lechuga y tomate. En sólo 9 de las muestras se determinó la presencia de hongos entomopatógenos, identificados como *I. fumosorosea* (Wize) Brown & Smith, *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin, y *Lecanicillium* sp. Gams & Zare (= *Verticillium* sp.) (tabla 9). Estos hongos corresponden al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales, Familia Cordycipitaceae.

Tabla 9: Descripción de los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de muestras de suelo provenientes de las plantaciones hortícolas.

Hongo identificado	Colección CEPAVE ^o	Sustrato ⁺	Plantación Hortícola ⁺	Ubicación	Fecha de muestreo
<i>Isaria fumosorosea</i>	-	suelo	chaucha	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	22/05/2007
<i>Isaria fumosorosea</i>	-	suelo	acelga	Colonia Urquiza, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 4)	06/06/2007
<i>Beauveria bassiana</i>	-	suelo	berenjena	Abasto, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 3)	04/06/2008
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 317	suelo	berenjena	Abasto, Partido de La Plata, Buenos Aires (Sitio 3)	25/06/2008
<i>Lecanicillium</i> sp.	CEP 318	suelo	tomate	Los Hornos, Partido de La Plata, Buenos Aires (sitio 10)	18/06/2008

^o Número de referencia para la colección del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CCT-La Plata-UNLP), La Plata, Argentina.

⁺ Muestras de suelo extraídas de plantaciones hortícolas bajo cubierta (invernáculo).

Hay que destacar que en las muestras de suelo provenientes de las plantaciones de chaucha del establecimiento 4, se aisló el hongo *I. fumosorosea* (tabla 9), lo cual se relaciona con la epizootia observada en las poblaciones de *T. vaporariorum* durante el muestreo del 22 de mayo del 2007 (figura 22), indicando que el suelo podría ser una fuente de reserva de los hongos entomopatógenos.

3.2.3. Caracterización morfológica de los hongos patógenos de “mosca blanca”

Los 15 aislamientos fúngicos obtenidos a partir de adultos de *T. vaporariorum* fueron identificados como *I. fumosorosea* (Wize) Brown & Smith (Ascomycota: Sordariomycetes: Hypocreales: Cordycipitaceae). Al analizar las características morfológicas de éstos aislamientos, se observó que presentaban diferencias en la tasa de crecimiento, la coloración del micelio fúngico y en las dimensiones de las estructuras reproductivas.

Las colonias presentaron un crecimiento moderadamente rápido en medio de cultivo SDYA, alcanzando un diámetro promedio de $32,3 \pm 1,60$ mm a los 10 días de incubación a 25° C en oscuridad. El diámetro de la colonia osciló entre $22,5 \pm 2,5$ mm del aislamiento CEP 316 y $47,9 \pm 0,15$ mm del aislamiento CEP 315 (tabla 10). La tasa de crecimiento fue significativamente diferentes entre los aislamientos fúngicos (ANOVA $F= 5,56$ $g.l= 14$ $p= 0,0001$), observando el valor máximo en el aislamiento CEP 315 ($4,4 \pm 0,10$ mm/día) y el valor mínimo en los aislamientos CEP 314 ($2,5 \pm 0,44$ mm/día) y CEP 316 ($2,3 \pm 0,25$ mm/día) (tabla 10).

El micelio fúngico de la mayoría de los aislamientos presentó un aspecto algodonoso y pulverulento, de color blanco al comienzo tornándose gris-rosáceo al transcurrir el tiempo de incubación. El micelio del aislamiento CEP 304 presentó una coloración amarillenta (figura 25), lo cual es de esperar en la especie *Isaria farinosa* y no de *I. fumosorosea*. El reverso del micelio fúngico mostró una pigmentación amarillenta en todos los aislamientos.

Los sinemas presentaron una posición erecta que, en la mayoría de los casos, permitió adherirse a la tapa de la cápsula de Petri. La longitud de los sinemas fue de aproximadamente 4 mm y presentaron un color blanco amarillento.

Se debe destacar que en el micelio del aislamiento CEP 315 se observó la presencia de gotas de exudado de color amarillo.

El inicio de la esporulación se observó entre el séptimo y el décimo día de incubación a 25° C en condiciones de oscuridad, observando una esporulación temprana (séptimo día) en el aislamiento CEP 315 y una esporulación tardía (12 días) en los aislamientos CEP 302, CEP 304, CEP 312, CEP 314 y CEP 316. Este retraso en la esporulación podría relacionarse con la tasa de crecimiento, ya que en estos casos la tasa de crecimiento fue menor que en CEP 315 (tabla 10).

Tabla 10: Descripción macroscópica de de los aislamientos fúngicos de *I. fumosorosea*

N° colección CEPAVE	color de la colonia	diámetro de colonia (mm) ⁺	Tasa de crecimiento (mm/día)*
CEP 302	blanco rosáceo	27,5 (1,66)	2,8 (0,17) efg
CEP 303	blanco	29,0 (1,22)	2,9 (0,12) cdefg
CEP 304	blanco amarillento	36,0 (3,39)	3,3 (0,30) bcde
CEP 305	blanco	35,5 (2,10)	3,6 (0,21) bc
CEP 306	gris-rosáceo	27,3 (2,33)	2,7 (0,23) defg
CEP 307	blanco rosáceo	33,5 (1,22)	3,4 (0,12) bcdef
CEP 308	gris-rosáceo	33,0 (0,88)	3,3 (0,09) bcdef
CEP 309	gris-rosáceo	35,5 (2,10)	3,6 (0,21) bc
CEP 310	blanco rosáceo	31,7 (2,19)	3,2 (0,22) bcdefg
CEP 311	blanco rosáceo	36,8 (0,92)	3,7 (0,09) b
CEP 312	blanco rosáceo	28,1 (1,76)	2,8 (0,18) fg
CEP 313	gris-rosáceo	35,0 (1,22)	3,5 (0,12) bcd
CEP 314	gris-rosáceo	24,7 (4,41)	2,5 (0,44) g
CEP 315	gris-rosáceo	47,9 (0,15)	4,4 (0,10) a
CEP 316	gris-rosáceo	22,5 (2,50)	2,3 (0,25) g

⁺ Diámetro promedio de la colonia (error estándar) determinado a los 10 días post-incubación a 25° C en condiciones de oscuridad.

* Tasa de crecimiento promedio (error estándar) determinado como el diámetro de colonia/el tiempo de incubación. Las letras indican diferencias significativas entre las medias de cada aislamiento obtenidas por el Test de Fisher (LSD) ($p < 0,05$).

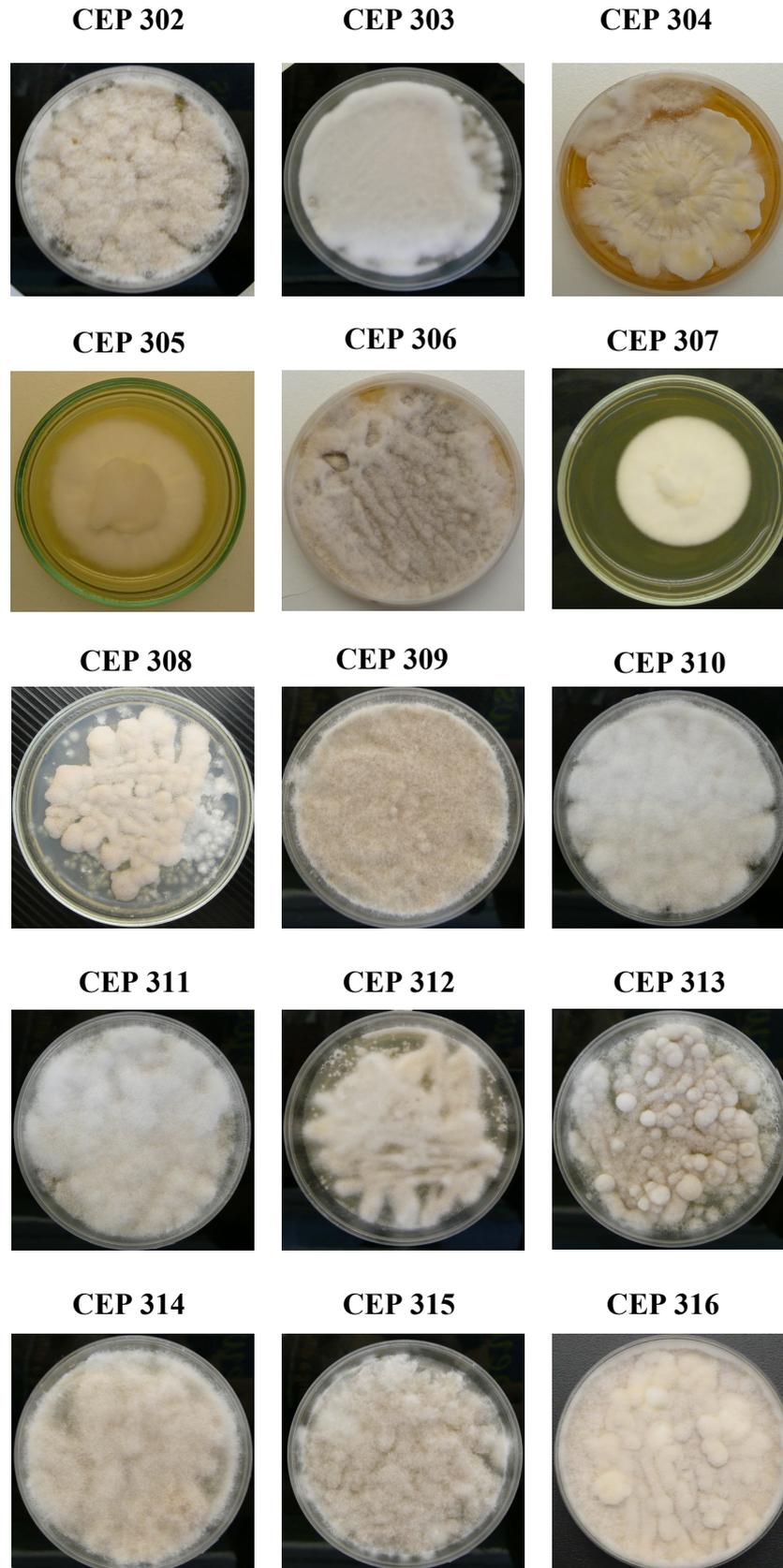


Figura 25: Desarrollo en cultivos *in vitro* de los aislamientos fúngicos de *I. fumosorosea*.

Se sembraron cada uno de los aislamientos fúngicos en medio de cultivo SDYA y se incubaron a 25° C en condiciones de oscuridad durante 20 días.

Las hifas vegetativas como los conidióforos presentaron paredes hialinas y lisas. Los conidióforos mostraron ramas verticiladas con 3 fiálides (células conidiógenas), las cuales se caracterizaron por presentar una porción globosa basal que se adelgaza formando un cuello terminal (figura 26). Las dimensiones promedio de las fiálides fueron de $5,60 \pm 0,24$ mm de largo y $2,19 \pm 0,08$ mm de ancho, oscilando entre $4,7 \pm 0,56 \times 2,0$ mm para CEP 305 y $7,2 \pm 0,37 \times 2,6 \pm 0,25$ para CEP 315 (tabla 11). Los conidios presentaron una forma ovoide o fusiforme con paredes hialinas y lisas (figura 26). El tamaño de los conidios varió significativamente entre los aislamientos fúngicos (ANOVA $F= 11,96$ g.l= 14 $p= 0,00001$), observando el valor máximo en CEP 306 ($5,6 \pm 0,24 \times 2,3 \pm 0,13$), y el valor mínimo en CEP 305 ($2,9 \pm 0,14 \times 2 \pm 0,00$) (tabla 11). El tamaño promedio de los conidios fue de $3,73 \pm 0,18 \times 2 \pm 0,03$.

El porcentaje de germinación de los conidios no difirió significativamente entre los aislamientos fúngicos (ANOVA $F= 0,77$ g.l= 14 $p= 0,69$), obteniendo valores superiores al 90 %, excepto en el aislamiento CEP 311 que fue del 79,22 % (tabla 11).

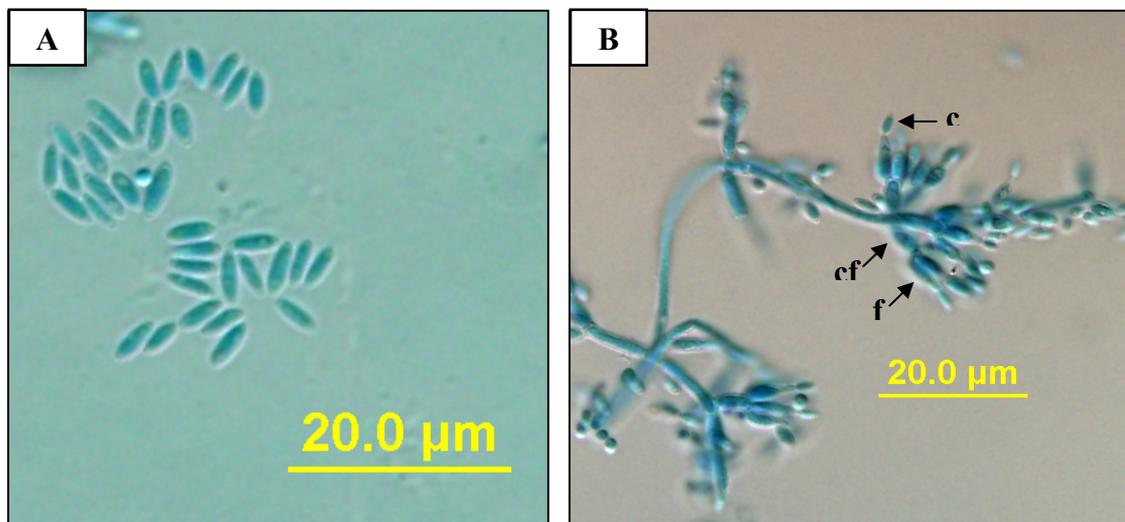


Figura 26: Observación microscópica de los conidios, fiálides y conidióforos de *I. fumosorosea*.

A partir de cultivos *in vitro* de *I. fumosorosea*, se realizaron preparados microscópicos con el colorante azul de algodón-lactofenol de Ammann (0,01 p/v). **A:** Conidios fusiformes de *I. fumosorosea*. **B:** Estructuras reproductivas de *I. fumosorosea*, destacando los conidióforos (**cf**), las fiálides (**f**) y los conidios (**c**).

Tabla 11: Descripción microscópica de los aislamientos fúngicos de *I. fumosorosea*

N° Colección CEPAVE	CONIDIOS			FIALES	
	Forma	Tamaño (µm) ⁺	Germinación (%) [*]	Número por rama	tamaño (µm) ⁺
CEP 302	fusiforme	3,7 (0,25) X 1,9 (0,05) de	97,89 (0,01) a	3 fiálides	6,0 (0,00) X 2,0 (0,00)
CEP 303	fusiforme	3,6 (0,23) X 2,2 (0,16) de	98,55 (0,01) a	3 fiálides	5,3 (0,11) X 2,5 (0,20)
CEP 304	ovoide	3,2 (0,20) X 2,0 (0,10) efg	98,36 (0,01) a	ND	ND
CEP 305	ovoide	2,9 (0,14) X 2,0 (0,00) g	97,01 (0,02) a	3 fiálides	4,7 (0,56) X 2,0 (0,00)
CEP 306	fusiforme	5,6 (0,24) X 2,3 (0,13) a	90,00 (0,09) a	ND	ND
CEP 307	fusiforme	4,4 (0,17) X 2,0 (0,00) b	94,81 (0,05) a	ND	ND
CEP 308	ovoide	3,3 (0,22) X 1,9 (0,07) efg	95,72 (0,03) a	3 fiálides	5,3 (0,29) X 2,1 (0,17)
CEP 309	ovoide	3,0 (0,18) X 1,9 (0,10) fg	91,92 (0,06) a	3 fiálides	5,3 (0,21) X 2,1 (0,20)
CEP 310	ovoide	3,2 (0,25) X 2,1 (0,05) efg	97,22 (0,01) a	3 fiálides	5,4 (0,51) X 2,4 (0,25)
CEP 311	fusiforme	3,5 (0,20) X 1,8 (0,09) def	79,22 (0,18) a	3 fiálides	6,0 (0,00) X 2,0 (0,00)
CEP 312	ovoide	3,9 (0,24) X 2,1 (0,05) bcd	98,07 (0,04) a	ND	ND
CEP 313	fusiforme	3,5 (0,21) X 2,0 (0,00) def	98,15 (0,00) a	ND	ND
CEP 314	fusiforme	3,6 (0,28) X 2,0 (0,00) cdef	99,11 (0,00) a	ND	ND
CEP 315	fusiforme	4,3 (0,18) X 2,0 (0,00) bc	99,29 (0,00) a	3 fiálides	7,2 (0,37) X 2,6 (0,25)
CEP 316	fusiforme	4,4 (0,17) X 2,0 (0,07) b	98,82 (0,00) a	3 fiálides	5,1 (0,34) X 2,0 (0,00)

⁺ Mediciones del largo y ancho de los conidios y fiálides (error estándar) realizadas bajo microscopio con contraste de fase. Las letras indican las diferencias significativas obtenidas por el Test de Fisher (LSD) ($p < 0,05$).

^{*} Porcentaje de germinación (error estándar) determinado a las 24hs post-inoculación. Las letras representan las diferencias significativas según el test de Fisher (LSD) ($p < 0,05$).

ND: valores no determinados.

3.2.4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial y la viabilidad de *I. fumosorosea* (CEP 315)

La mayoría de los hongos entomopatógenos tienen un amplio rango de tolerancia a la temperatura, sin embargo, la temperatura óptima para el desarrollo de micelio y viabilidad de los conidios es más restringida. Por eso, se evaluó el crecimiento radial, la tasa de crecimiento y el porcentaje de germinación del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* a 16°, 20°, 25° y 33° C. La selección del aislamiento CEP 315 se basó en su rápido crecimiento y su elevado porcentaje de germinación de los conidios en comparación con el resto de los aislamientos fúngicos.

Al analizar el diámetro de colonia y la tasa de crecimiento de CEP 315, se observó una diferencia significativa entre las temperaturas de incubación (ANOVA $F=37,77$ g.l= 3 $p= 0,00001$), destacando a los 33° C una disminución en el diámetro de la colonia (13,3 mm) y en la tasa de crecimiento (1,03 mm/día) (tabla 12). Cuando la cepa CEP 315 se incubó a 16° C, se observó una pequeña reducción en el diámetro de la colonia (43,3 mm), y en la tasa de crecimiento (4,37 mm/día), sin embargo, estos valores no fueron significativamente diferentes a los obtenidos a 20° y 25° C (tabla 12).

El porcentaje de germinación difirió significativamente entre las temperaturas de incubación (ANOVA $F= 636,16$ g.l= 3 $p= 0,00001$), observando los valores máximos a 20° y 25° C (99,57 % y 98,78 %, respectivamente), un valor intermedio a los 16° C (98,30 %) y el valor mínimo a los 33° C (3,25 %) (tabla 12).

En función de estos resultados se podría indicar que a los 20° y 25° C, se observó el máximo crecimiento radial, una mayor velocidad de crecimiento y un elevado porcentaje de germinación, indicando que estas temperaturas son óptimas para *I. fumosorosea* (CEP 315).

Tabla 12: Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y el porcentaje de germinación del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*.

Temperatura	Diámetro de la colonia (mm) ⁺	Tasa de crecimiento diaria (mm/día) *	Germinación (%)
16° C	43,3 (0,577) a	4,37 (0,577) a	98,30 (0,002) b
20° C	46,6 (0,333) a	4,73 (0,333) a	99,57 (0,001) a
25° C	46,0 (0,208) a	4,67 (0,208) a	99,78 (0,001) a
33° C	13,3 (0,088) b	1,03 (0,088) b	3,25 (0,003) c

⁺ Diámetro promedio de la colonia (error estándar) determinado a los 9 días post-incubación a 25° C en condiciones de oscuridad.

* Tasa de crecimiento promedio (error estándar) determinado como el diámetro de colonia/ el tiempo de incubación

Las letras indican las diferencias significativas dentro de cada columna (Test de Fisher (LSD) $p < 0,05$).

3.2.5. Caracterización de los hongos patógenos de “mosca blanca” por técnicas de biología molecular

Los 15 aislamientos fúngicos de *I. fumosorosea* fueron identificados según sus características morfológicas, sin embargo, algunos de éstos presentaron características ambiguas que ocasionaron una identificación dudosa. Por lo tanto, se decidió confirmar la identificación mediante técnicas moleculares y analizar si existía variabilidad genética entre los aislamientos. Para ello, se utilizaron cepas de referencias, provenientes de diferentes colecciones micológicas, correspondiendo a las siguientes especies: *I. fumosorosea* (Wize) Brown & Smith, *I. farinosa* (Holmsk.) Fries, *I. javanica* (Friederichs & Bally) Samson & Hywel-Jones, *I. amoenorosea* (Hennings) Samson, e *I. tenuipes* (Peck). Así mismo, se consiguieron 4 aislamientos de *Isaria spp*, a los cuales se le confirmó su identidad junto con los 15 aislamientos obtenidos en este trabajo de investigación (tabla 13).

De un total de 33 aislamientos fúngicos, 25 fueron aislados de individuos de “mosca blanca” (*T. vaporariorum* o *B. tabaci* biotipo B) de Argentina o de Brasil, 6 de otros insectos como Lepidópteros, Himenópteros y Coleópteros (*Scaptocoris castanea* y *Lagria villosa*) de Argentina y Brasil, y 2 de suelo cercano a plantaciones de maíz de Argentina (tabla 13).

A partir de cultivos líquidos de los 33 aislamientos, se filtró y recolectó el micelio fúngico. Este micelio fue triturado con nitrógeno líquido y se utilizó para la extracción del ADN con el detergente CTBA (bromuro de cetiltrimetilamonio). Una vez, obtenido el material genético de cada aislamiento se realizó una amplificación por PCR de dos genes nucleares: el factor de elongación 1 α (EF1- α) y los espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal (ITS). La amplificación con los primers 983F y 2218R originó un único fragmento de 1100pb (figura 27, línea 1) en todos los aislamientos fúngicos, correspondiendo al extremo 3' del gen del factor de elongación 1 α . Por el otro lado, la amplificación con los primers TW81F y AB28R, originó un fragmento de 600 pb (figura 30, línea 1) en todos los aislamientos, correspondiendo al extremo 3' del ADN ribosomal 18S, la región espaciadora interna 1 (ITS1), el gen del ADN ribosomal 5,8S, la región espaciadora interna 2 (ITS2) y el extremo 5' del ADN ribosomal 28S.

Tabla 13: Lista de los aislamientos utilizados en la caracterización por técnicas moleculares.

N° acceso ^{a, b}	N° ARSEF ^c	Especie fúngica	Insecto hospedador/ sustrato	Region geográfica
Aislamientos de referencia				
CEP 051 ^a	7204	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 055 ^a	7205	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CNPSo-79 ^b	5156	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Bemisia tabaci</i> biotipo B	Estado de Paraná, Brasil
CNPSo-83 ^b	5160	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Bemisia tabaci</i> biotipo B	Estado de Paraná, Brasil
CNPSo-121 ^b	3303	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Bemisia tabaci</i> biotipo B	Colina, Mexico
CNPSo-162 ^b	-	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Scaptocoris castanea</i>	Mato Grosso, Brasil
CEP 029 ^a	6717	<i>Isaria farinosa</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 004 ^a	7777	<i>Isaria farinosa</i>	Suelo	Buenos Aires, Argentina
CEP 005 ^a	-	<i>Isaria farinosa</i>	Suelo	Buenos Aires, Argentina
CEP 107 ^a	7477	<i>Isaria javanica</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CNPSo-112 ^b	-	<i>Isaria amoenorosea</i>	<i>Lagria villosa</i>	Estado de Paraná, Brasil
CNPSo-41	3938	<i>Isaria tenuipes</i>	Lepidoptera	Estado de Paraná, Brasil
CNPSo-96 ^b	-	<i>Isaria tenuipes</i>	Lepidoptera	Estado de Paraná, Brasil
CNPSo-97 ^b	-	<i>Isaria tenuipes</i>	Lepidoptera	Estado de Paraná, Brasil
Aislamientos para identificar				
CNPSo-104 ^b	-	<i>Isaria</i> sp.	<i>Bemisia tabaci</i> biotipo B	Brasilia, Brasil
CNPSo-105 ^b	-	<i>Isaria</i> sp.	<i>Bemisia tabaci</i> biotipo B	Brasilia, Brasil
CNPSo-106 ^b	-	<i>Isaria</i> sp.	<i>Bemisia tabaci</i> biotipo B	Brasilia, Brasil
CEP 049 ^a	-	<i>Isaria</i> sp.	Hymenoptera	Buenos Aires, Argentina
CEP 302 ^a	8716	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 303 ^a	8717	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 304 ^a	8718	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 305 ^a	8719	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 306 ^a	8720	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 307 ^a	8721	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 308 ^a	8723	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 309 ^a	8724	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 310 ^a	8725	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 311 ^a	8726	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 312 ^a	8727	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 313 ^a	8728	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 314 ^a	8729	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 315 ^a	8730	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina
CEP 316 ^a	8928	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Buenos Aires, Argentina

^a Número de acceso para la colección del CEPAVE (CCT-La Plata-UNLP), La Plata, Argentina.

^b Número de acceso de la colección de EMBRAPA Soja, Londrina, Brasil.

^c Número de acceso de la colección de ARSEF, Ithaca, Nueva York, EE.UU.

Con el fin de estudiar la variabilidad genética de las especies de referencia de *Isaria* y los aislamientos con características morfológicas confusas, se realizó la digestión con 6 enzimas de restricción (*Alu* I, *Hae* III, *Mbo* I, *Hpa* II, *Taq* I y *Hha* I) de los productos de PCR del gen EF1- α (983F-2218R) y de los productos de PCR del gen ITS1-5,8S-ITS2 (TW81F-AB28R) provenientes de los aislamientos de referencia.

Al digerir el fragmento de 1100 pb de EF1- α (983F-2218R) con las enzimas *Alu* I, *Taq* I y *Hha* I se logró una digestión parcial del fragmento y el patrón de restricción obtenido no permitió diferenciar las especies de *Isaria* (figura 27). Sin embargo, las enzimas *Hae* III, *Mbo* I y *Hpa* II produjeron un perfil de restricción diferente entre los aislamientos de *I. fumosorosea*, *I. farinosa* e *I. tenuipes* (figura 27), siendo *Hae* III la enzima que generó un polimorfismo interespecífico más claro. El patrón de restricción de EF1- α (983F-2218R) de los aislamientos de *I. javanica* e *I. amoenorosea* fue idéntico al perfil de restricción de *I. fumosorosea* (figura 27), sugiriendo que éstos aislamientos serían semejantes genéticamente, que la identificación morfológica fue errónea o que el material fúngico utilizado estaba contaminado.

La digestión de EF1- α (983F-2218R) con *Hae* III generó un polimorfismo que discrimina entre las especies *I. fumosorosea*, *I. farinosa* e *I. tenuipes* (figura 27 y 28). El perfil de restricción de los aislamientos de *I. fumosorosea* consistió en 6 fragmentos de aproximadamente 400 pb, 220 pb, 140 pb, 100 pb, 80 pb y 60 pb (figura 28, líneas 17 y 18). El perfil de restricción de *I. farinosa* comprendió 4 fragmentos de 800 pb, 100 pb, 80 pb y 60 pb (figura 28, líneas 19 y 20). El patrón de restricción de *I. tenuipes* consistió en 5 fragmentos de 380 pb, 300 pb, 220 pb, 80 pb y 60 pb (figura 28, líneas 21 y 22).

Una vez determinada la enzima que generó un polimorfismo interespecífico, se decidió digerir los 15 aislamientos obtenidos durante este proyecto de investigación (CEP 302 a CEP 316) y los 4 aislamientos de *Isaria* sp. (CEP 049, CNPSo-104, CNPSo-105 y CNPSo-106) para evaluar su variación genética y, si es posible, determinar su identificación molecular por comparación de los perfiles de restricción.

Al llevar a cabo la digestión del fragmento de 1100pb de EF1- α (983F-2218R) con la enzima *Hae* III, se observó que los 15 aislamientos fúngicos obtenidos de adultos de *T. vaporariorum* (CEP 302 a CEP 316) presentaron un perfil de restricción idéntico a los aislamientos de referencia de *I. fumosorosea* (figura 28, líneas 2 a 16). Asimismo, los 3 aislamientos de *Isaria* sp obtenidos de *B. tabaci* biotipo B (CNPSo-104, CNPSo-105 y CNPSo-106) mostraron un perfil de restricción semejante a *I. fumosorosea* (figura 28, líneas 24, 25 y 26). Por el contrario, el aislamiento CEP 049 de Himenópteros

presentó un perfil de restricción idéntico a los aislamientos de referencia de *I. farinosa* (figura 28, línea 23).

Cabe destacar que la digestión de EF1- α (983F-2218R) con la enzima *Hae* III no generó polimorfismos intraespecífico.

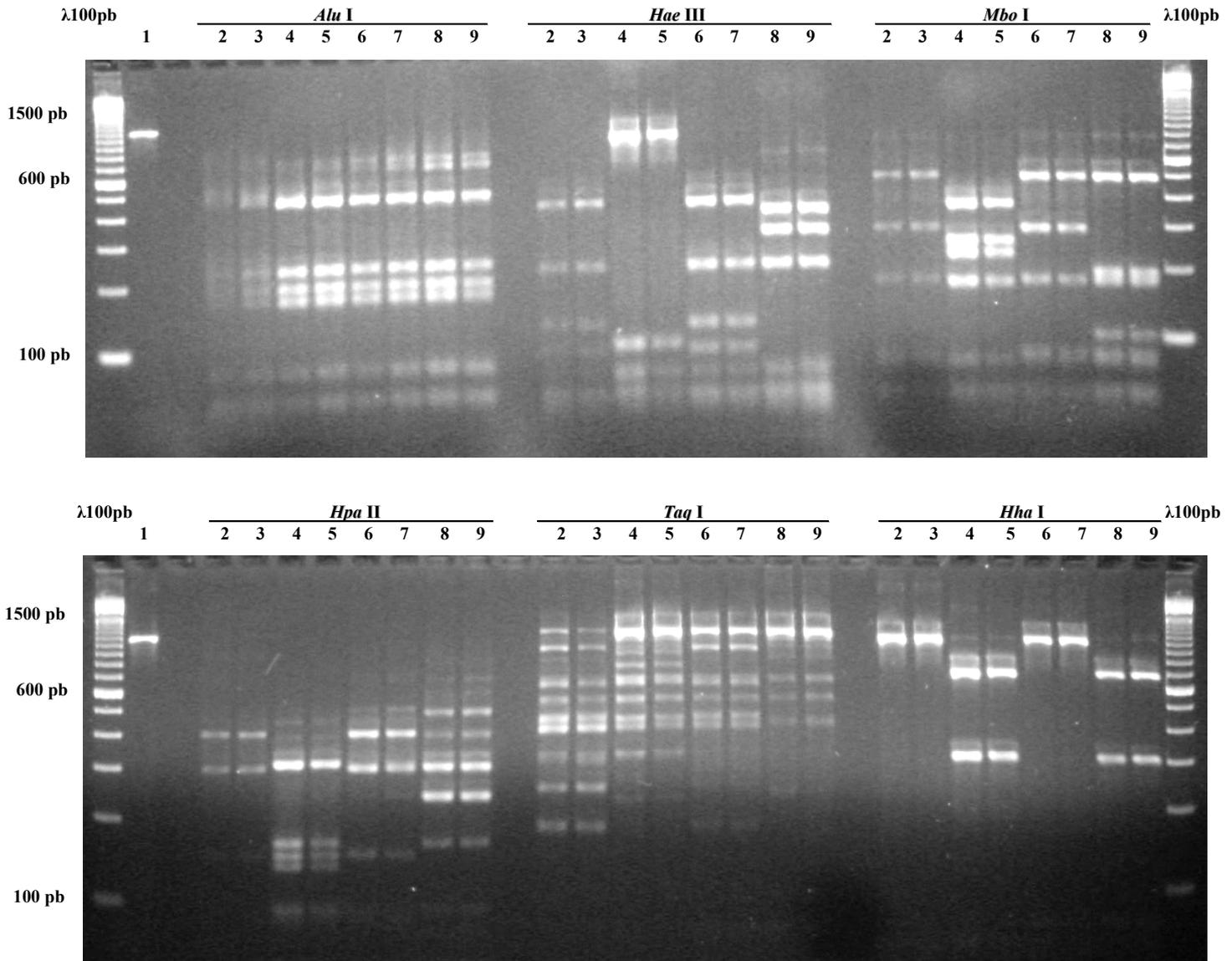


Figura 27: Perfil de restricción de EF1- α (983F-2218R) de los aislamientos de referencia de *Isaria*.

La amplificación se llevó a cabo con los primers 983F y 2218R, y los productos de PCR fueron digeridos con *Alu* I, *Hae* III, *Mbo* I, *Hpa* II, *Taq* I y *Hha* I durante 3 horas a 37°C. Luego, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2 % y los geles fueron visualizados en un transiluminador con luz UV. **1:** Fragmento de EF1- α (983F-2218R) sin digerir. **2:** *I. fumosorosea* CEP 051. **3:** *I. fumosorosea* CNPSO-83. **4:** *I. farinosa* CEP 029. **5:** *I. farinosa* CEP 005. **6:** *I. javanica* CEP 107. **7:** *I. amoenorosea* CNPSO-112. **8:** *I. tenuipes* CNPSO-41. **9:** *I. tenuipes* CNPSO-96. **λ100pb** marcador de peso molecular. Los números a la izquierda representan los pesos moleculares.

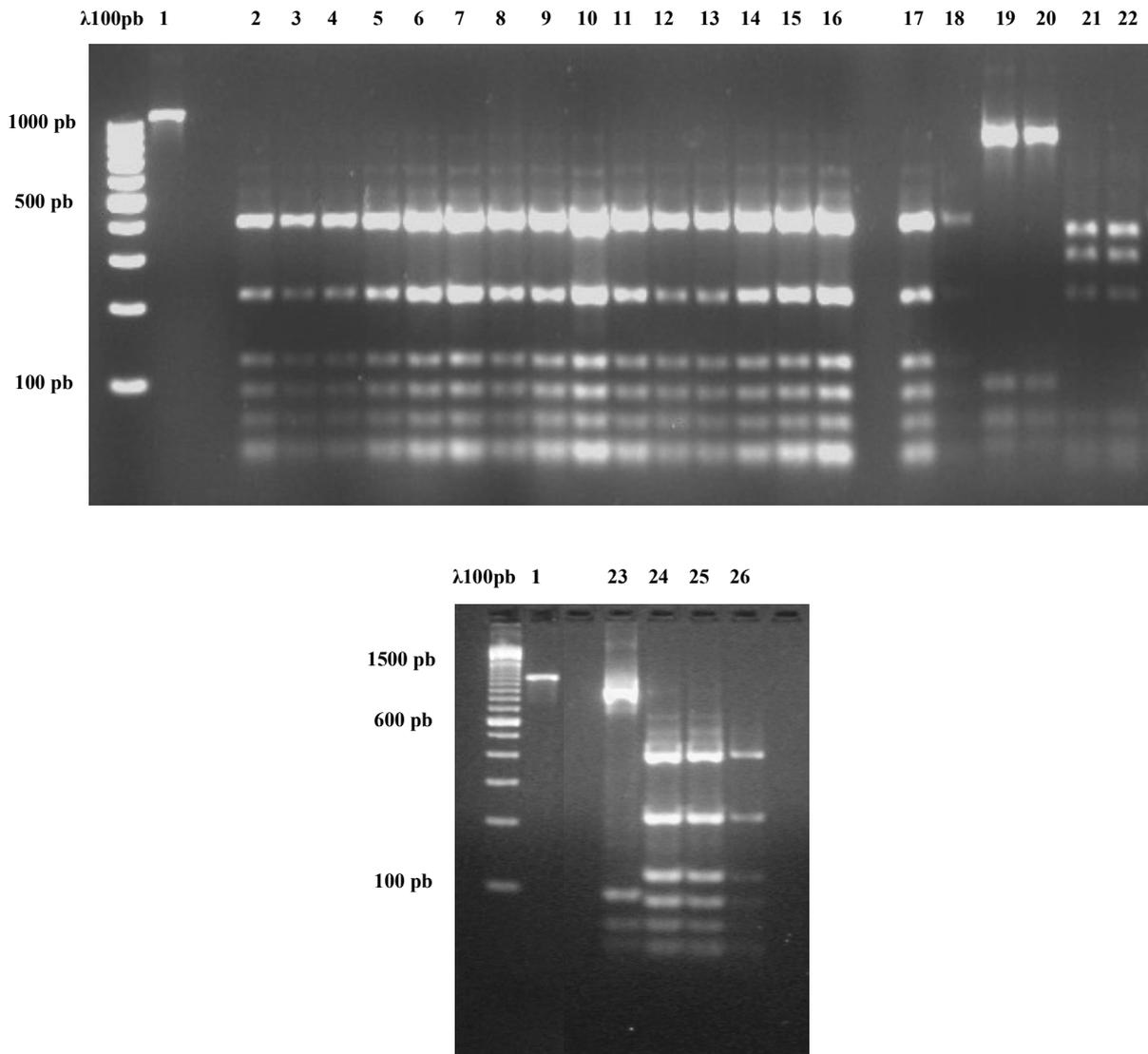


Figure 28: Perfil de restricción de EF1- α (983F-2218R) usando la enzima *Hae* III.

La amplificación se llevo a cabo con los primer 983F y 2218R, y los productos de PCR fueron digeridos con *Hae* III durante 3 horas a 37°C. Luego, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2 % y los geles fueron visualizados en un transiluminador con luz UV. **1:** Fragmento de EF1- α (983F-2218R) sin digerir. **2:** *I. fumosorosea* CEP 302. **3:** *I. fumosorosea* CEP 303. **4:** *I. fumosorosea* CEP 304. **5:** *I. fumosorosea* CEP 305. **6:** *I. fumosorosea* CEP 306. **7:** *I. fumosorosea* CEP 307. **8:** *I. fumosorosea* CEP 308. **9:** *I. fumosorosea* CEP 309. **10:** *I. fumosorosea* CEP 310. **11:** *I. fumosorosea* CEP 311. **12:** *I. fumosorosea* CEP 312. **13:** *I. fumosorosea* CEP 313. **14:** *I. fumosorosea* CEP 314. **15:** *I. fumosorosea* CEP 315. **16:** *I. fumosorosea* CEP 316. **17:** *I. fumosorosea* CEP 055. **18:** *I. fumosorosea* CNPSo-83. **19:** *I. farinosa* CEP 029. **20:** *I. farinosa* CEP 005. **21:** *I. tenuipes* CNPSo-41. **22:** *I. tenuipes* CNPSo-96. **23:** *Isaria* sp. CEP 049. **24:** *Isaria* sp. CNPSo-104. **25:** *Isaria* sp. CNPSo-105. **26:** *Isaria* sp. CNPSo-106. **lambda100pb** marcador de peso molecular. Los números a la izquierda representan los pesos moleculares.

Con el fin de confirmar las variaciones interespecíficas determinadas previamente, se realizó la digestión del fragmento de 600 pb de ITS1-5,8S-ITS2 (TW81F-AB28R) con 6 enzimas de restricción (*Alu* I, *Hae* III, *Mbo* I, *Hpa* II, *Taq* I y *Hha* I). Las enzimas *Alu* I y *Taq* I no digirieron el fragmento de 600 pb de ninguno de los aislamientos de referencias, indicando que no existen sitios de cortes para éstas enzimas en la región de ITS1-5,8S-ITS2 (TW81F-AB28R). Sin embargo, *Hae* III, *Mbo* I, *Hpa* II y *Hha* I digirieron completamente el fragmento de 600 pb, pero sólo las enzimas *Hae* III y *Hha* I originaron un patrón de restricción diferente entre los aislamientos de referencia de *I. fumososea*, *I. farinosa* e *I. tenuipes* (figura 29). El perfil de restricción de ITS1-5,8S-ITS2 (TW81F-AB28R) de los aislamientos de *I. amoenorozea* e *I. javanica* fue idéntico al perfil de *I. fumosorozea* (figura 29), destacando nuevamente que estos aislamientos serían genéticamente similares, que la identificación morfológica fue errónea o que el material fúngico utilizado estaba contaminado.

La digestión con *Hae* III de la región de ITS1-5,8S-ITS2 (TW81F-AB28R) originó un polimorfismo ligeramente diferente entre las especies de *Isaria* (figura 30). El perfil de restricción de los aislamientos de referencia de *I. fumosorozea* consistió en 4 fragmentos de aproximadamente 300 pb, 120 pb, 80 pb y 60 pb (figura 30, líneas 17 y 18), mientras que el perfil de restricción de *I. farinosa* presentó 4 fragmentos de 280 pb, 100 pb, 80 pb y 60 pb (figura 30, líneas 19 y 20). Las cepas de referencia de *I. tenuipes* originaron un perfil formado por 4 fragmentos de 250 pb, 120 pb, 80 pb y 60 pb (figura 30, líneas 21 y 22).

Al digerir con *Hae* III la región de ITS1-5,8S-ITS2 (TW81F-AB28R) de los 15 aislamientos obtenidos de adultos de *T. vaporariorum* (CEP 302 a CEP 316), se observó que todos presentaron un perfil de restricción idéntico a las cepas de referencias de *I. fumosorozea* (figura 30, líneas 2 a 16), confirmando la identificación realizada por características morfológicas. Cabe destacar que la digestión de ITS1-5,8S-ITS2 (TW81F-AB28R) con la enzima *Hae* III no generó polimorfismo intraespecífico.

En base a los resultados expuestos, se puede indicar que los genes nucleares EF1- α e ITS1-5,8S-ITS2, permitieron evaluar las variaciones genéticas entre las especies de *Isaria*, como así también, confirmar la identificación de los aislamientos con características morfológicas atípicas.

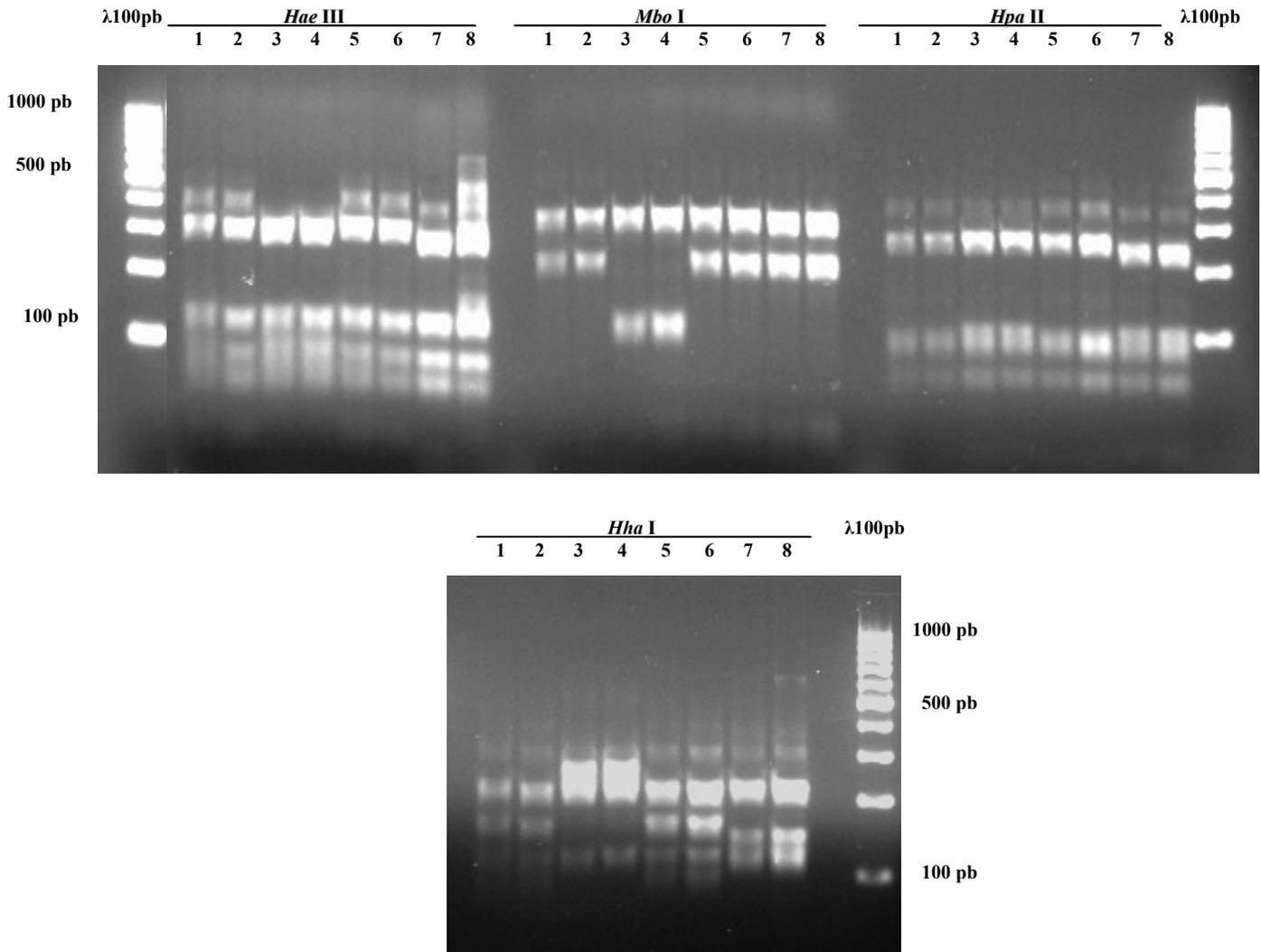


Figura 29: Perfil de restricción de ITS1-5,8S-ITS2 (TW81F-AB28R) de los aislamientos de referencia de *Isaria*.

La amplificación se llevo a cabo con los primer TW81F y AB28R, y los productos de PCR fueron digeridos con *Alu* I, *Hae* III, *Mbo* I, *Hpa* II, *Taq* I y *Hha* I durante 3 horas a 37°C. Luego, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2 % y los geles fueron visualizados en un transiluminador con luz UV. 1: *I. fumosorosea* CEP 051. 2: *I. fumosorosea* CNPSo-83. 3: *I. farinosa* CEP 029. 4: *I. farinosa* CEP 005. 5: *I. javanica* CEP 107. 6: *I. amoenorosea* CNPSo-112. 7: *I. tenuipes* CNPSo-41. 8: *I. tenuipes* CNPSo-96. λ 100pb marcador de peso molecular.

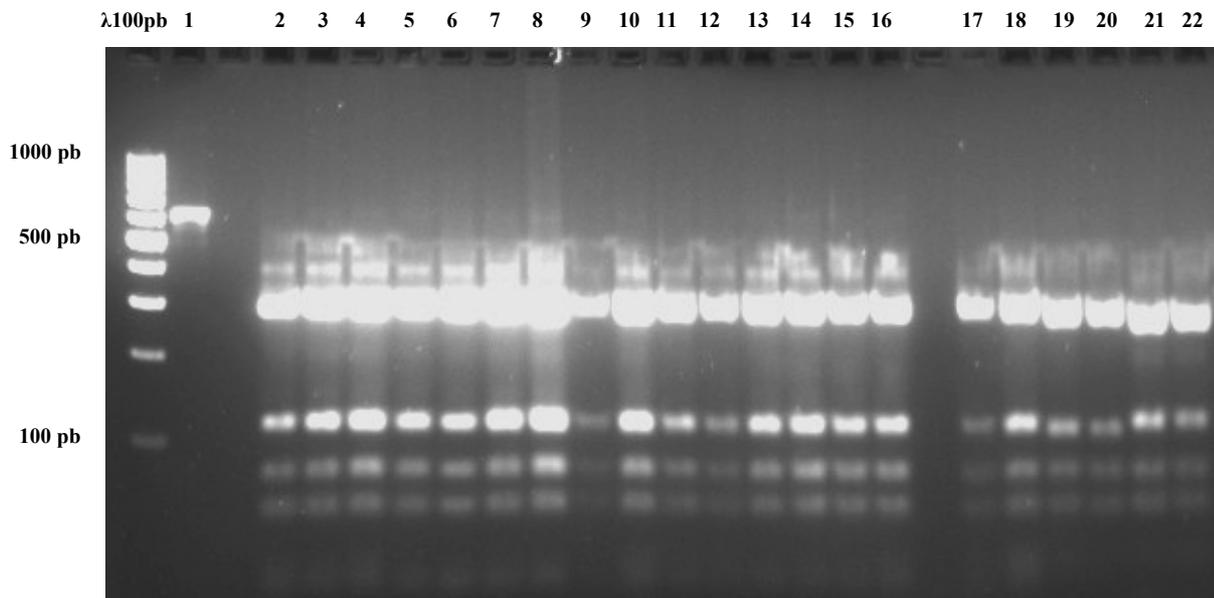


Figure 30: Perfil de restricción de ITS1-5,8S-ITS2 (TW81F-AB28R) usando la enzima *Hae* III.

La amplificación se llevo a cabo con los primer TW81F y AB28R, y los productos de PCR fueron digeridos con *Hae* III durante 3 horas a 37°C. Luego, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2% y los geles fueron visualizados en un transiluminador con luz UV. **1:** Fragmento de ITS1-ITS2 (TW81F-AB28R) sin digerir. **2:** *I. fumosorosea* CEP 302. **3:** *I. fumosorosea* CEP 303. **4:** *I. fumosorosea* CEP 304. **5:** *I. fumosorosea* CEP 305. **6:** *I. fumosorosea* CEP 306. **7:** *I. fumosorosea* CEP 307. **8:** *I. fumosorosea* CEP 308. **9:** *I. fumosorosea* CEP 309. **10:** *I. fumosorosea* CEP 310. **11:** *I. fumosorosea* CEP 311. **12:** *I. fumosorosea* CEP 312. **13:** *I. fumosorosea* CEP 313. **14:** *I. fumosorosea* CEP 314. **15:** *I. fumosorosea* CEP 315. **16:** *I. fumosorosea* CEP 316. **17:** *I. fumosorosea* CEP 055. **18:** *I. fumosorosea* CNPSO-83. **19:** *I. farinosa* CEP 029. **20:** *I. farinosa* CEP 005. **21:** *I. tenuipes* CNPSO-41. **22:** *I. tenuipes* CNPSO-96. **λ100pb:** marcador de peso molecular. Los números a la izquierda representan los pesos moleculares.

Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos sobre individuos de “mosca blanca”

3.3.1. Selección del aislamiento fúngico más patogénico para *T. vaporariorum* y *B. tabaci*

Los 15 aislamientos fúngicos de *I. fumosorosea* ocasionaron la infección y muerte de las ninfas de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*, observando el desarrollo de micelio externo blanco con aspecto algodonoso, y la emersión de las estructuras reproductivas (conidióforos, fiálides y conidios) luego de tres días posteriores a la muerte (figura 31).

El porcentaje de mortalidad de las ninfas de *T. vaporariorum* del tratamiento control y de los 15 aislamientos fúngicos, fue significativamente diferente (ANOVA $F=32,43$ g.l= 15 $p=0,00001$). Todos los aislamientos de *I. fumosorosea* ocasionaron un porcentaje de mortalidad superior al 80 %, observando el valor máximo en CEP 315 (100 %) y el valor mínimo en CEP 312 (81,67 %) (tabla 15).

La mortalidad de las ninfas de *B. tabaci*, fue significativamente diferente entre los aislamientos fúngicos y el control (ANOVA $F=6,34$ g.l= 15 $p=0,0019$). Todos los aislamientos de *I. fumosorosea* presentaron un porcentaje de mortalidad superior al 70%, observando el valor máximo en CEP 315 (100 %) y el valor mínimo en CEP 307 (70 %) (tabla 14).

Al comparar la mortalidad promedio de las ninfas del cuarto estadio de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*, se determinó que el porcentaje de mortalidad de *T. vaporariorum* ($91,82 \pm 1,52$ %) fue significativamente mayor al de *B. tabaci* ($84,17 \pm 2,60$ %) ($t=2,54$ $p=0,017$) (figura 32).

Por otra parte, se estimó el TL_{50} y TL_{90} de los 15 aislamientos fúngicos infectando las ninfas de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*. Los valores promedios del TL_{50} no presentaron diferencias significativas entre ambas especies de “mosca blanca” ($t=-1,31912$ $p=0,1978$), observando valores que oscilaron entre 2,5 a 3,91 días para *T. vaporariorum* y entre 2,48 a 4,85 días para *B. tabaci* (tabla 15). El TL_{90} fue determinado sólo en los aislamientos donde el porcentaje de mortalidad superó el 90 %, observando que los valores fluctuaron entre 4,45 a 7,05 días para *T. vaporariorum* y 4,14 a 5,76 días para *B. tabaci* (tabla 14).

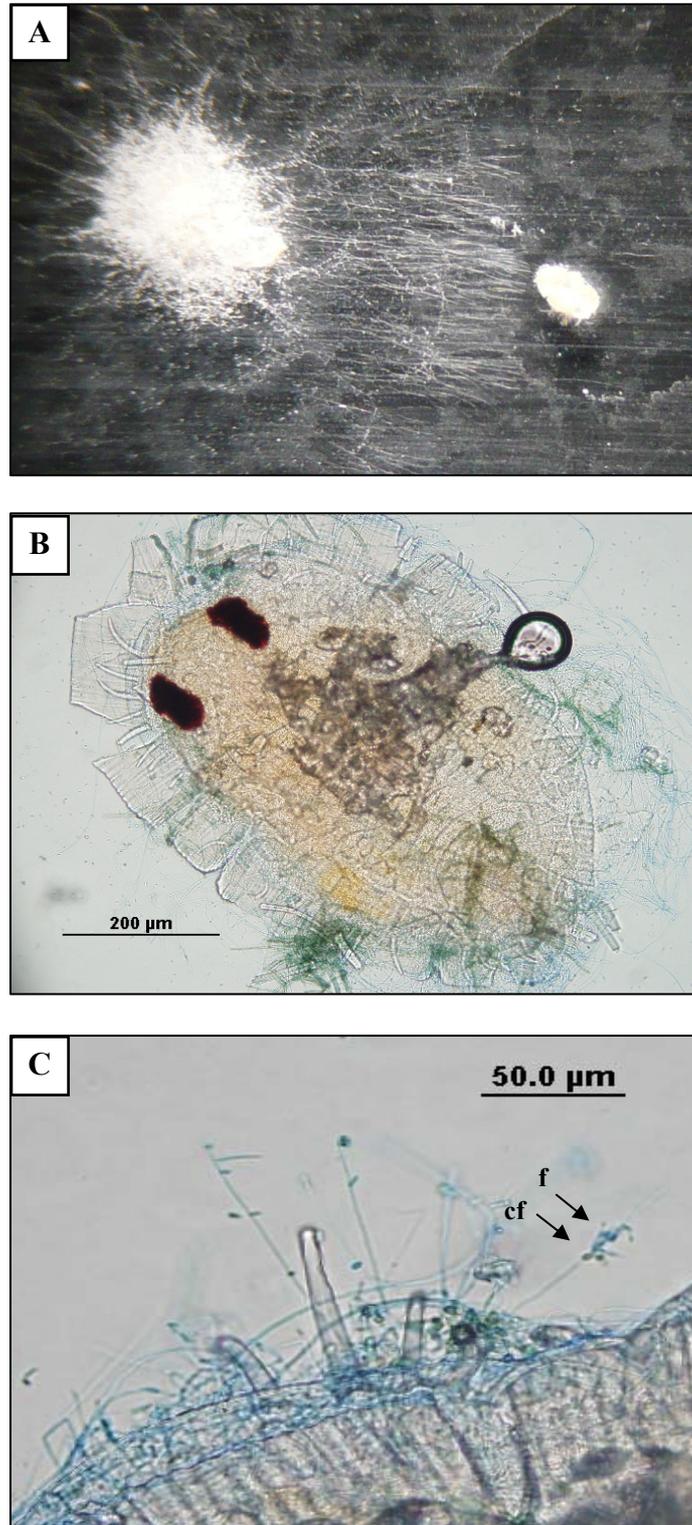


Figura 31: Ninfa del 4° estadio de *T. vaporariorum* infectada con *I. fumosorosea*.

A: Observación en una lupa binocular del aspecto de ninfas IV de *T. vaporariorum* infectadas con *I. fumosorosea* (izquierda) o sin infectar (derecha). **B y C:** Observación microscópica de una ninfa IV con desarrollo externo de micelio (**B**) y de las estructuras reproductivas de *I. fumosorosea* (**C**). **f:** filíides. **cf:** conidióforos.

Tabla 14: Determinación del porcentaje de mortalidad promedio y el tiempo letal de los aislamientos de *I. fumosorosea* contra ninfas del 4° estadio de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*.

Aislamiento fúngico	Ninfas de <i>T. vaporariorum</i>			Ninfas de <i>B. tabaci</i>		
	Mortalidad (%) *	TL ₅₀ (días) ⁺	TL ₉₀ (días) ⁺	Mortalidad (%) *	TL ₅₀ (días) ⁺	TL ₉₀ (días) ⁺
Control	5,00 (0,34) c	-	-	13,00 (0,07) c	-	-
CEP 302	98,34 (0,02) ab	3,31	4,77	93,33 (0,00) ab	2,49	5,21
CEP 303	91,67 (0,05) ab	3,596	6,41	96,67 (0,00) ab	2,79	4,71
CEP 304	83,33 (0,00) ab	3,59	ND	93,33 (0,00) ab	2,48	4,14
CEP 305	95,00 (0,02) ab	2,5	4,64	90,00 (0,00) ab	3,82	5,35
CEP 306	90,00 (0,10) ab	3,05	7,05	95,00 (0,00) ab	3,34	5,76
CEP 307	96,67 (0,00) ab	3,45	6,18	70,00 (0,00) b	4,81	ND
CEP 308	86,67 (0,10) ab	3,73	ND	78,34 (0,12) ab	3,56	ND
CEP 309	85,56 (0,10) ab	3,48	ND	78,00 (0,12) ab	4,49	ND
CEP 310	93,33 (0,02) ab	3,58	6,85	73,34 (0,11) b	4,85	ND
CEP 311	98,34 (0,02) ab	3,10	4,45	87,50 (0,13) ab	3,95	ND
CEP 312	81,67 (0,08) b	3,42	ND	76,67 (0,10) b	4,49	ND
CEP 313	93,34 (0,07) ab	2,97	5,58	83,33 (0,00) ab	2,56	ND
CEP 314	96,67 (0,01) ab	3,58	6,20	73,34 (0,03) b	4,16	ND
CEP 315	100,00 (0,00) a	3,22	5,06	100,00 (0,00) a	3,08	5
CEP 316	86,67 (0,13) ab	3,91	ND	73,33 (0,00) b	4,31	ND

* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) a los 7 días posteriores a la inoculación. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada columna (Test de Tukey $p < 0,05$).

⁺ Tiempo letal 50 y 90 (TL₅₀ y TL₉₀) calculado con el programa Micro Probit.

ND: valor no determinado.

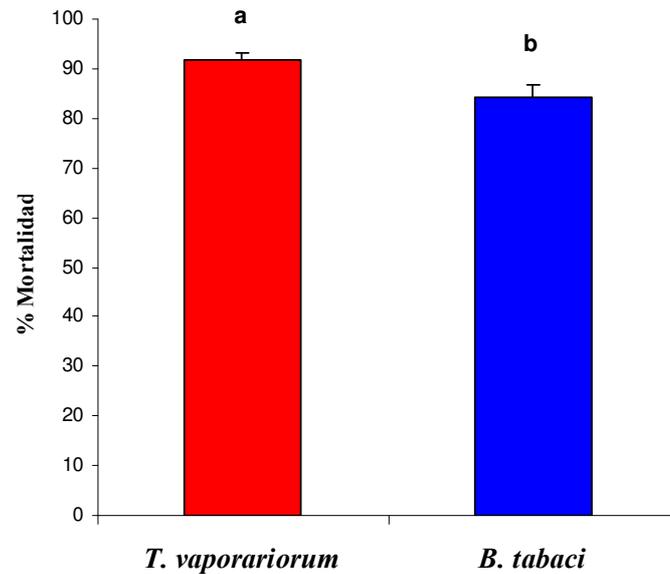


Figura 32: Porcentaje de mortalidad promedio de las ninfas de *T. vaporariorum* y *B. tabaci* infectadas con *I. fumosorosea*.

Ninfas del 4° estadio de desarrollo de *T. vaporariorum* o *B. tabaci* fueron expuestas a una suspensión de 1×10^7 conidios/ml de *I. fumosorosea* e incubadas durante 7 días a 25° C en condiciones de oscuridad. Diariamente, se cuantificó el número de ninfas con desarrollo de micelio externo y se estimó el porcentaje de mortalidad promedio a los 7 días posteriores a la inoculación. Las barras indican el porcentaje de mortalidad y el error estándar. Las letras representan las diferencias significativas obtenidas por el test de Student ($p < 0,05$).

En función de los resultados expuestos, se puede indicar que los 15 aislamientos de *I. fumosorosea* fueron altamente infectivos para las dos especies de “mosca blanca”. La mortalidad promedio de las ninfas de *T. vaporariorum* fue superior a *B. tabaci*, y el tiempo letal medio y noventa de todos los aislamientos fúngicos fue similar en ambas especies, observando un 50 % de mortalidad a los 3 días y un 90 % a los 5 días posteriores a la inoculación. El aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* ocasionó el 100% de infección en los individuos de *T. vaporariorum* y en *B. tabaci*, lo cual destaca su elevada patogenicidad para ambas especies de “mosca blanca” y, por consiguiente, fue seleccionado para continuar evaluando los parámetros de patogenicidad.

3.3.2. Evaluación de la susceptibilidad de todos los estados de desarrollo de *T. vaporariorum* al aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*

El aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* ocasionó la infección de todos los estadios ninfales y adultos de *T. vaporariorum*, observando el desarrollo de un micelio blanco de aspecto algodonoso que cubrió todo el cuerpo del insecto (figura 33). Sin embargo, no se observó ningún síntoma de infección fúngica en los huevos de *T. vaporariorum*.

Al comparar la mortalidad de los estados de desarrollo, se determinó que existen diferencias significativas entre los estadios ninfales y los adultos (ANOVA $F=5,56$ $g.l=4$ $p=0,001$). Los porcentajes de mortalidad de los adultos (59,76 %) y las ninfas del segundo y tercer estadio (49,76 % y 50,27 %, respectivamente) fueron significativamente mayores que los porcentajes obtenidos para las ninfas del primer y cuarto estadio (9,43 % y 5,66 %, respectivamente) (tabla 15). En todos los estados de desarrollo (excepto los huevos), los valores de mortalidad fueron significativamente superiores al tratamiento control. Por lo tanto, se podría destacar que los estados inmaduros (ninfas II y III) y los adultos de *T. vaporariorum* son los individuos más susceptibles a la infección por *I. fumosorosea* (CEP 315) (figura 34).

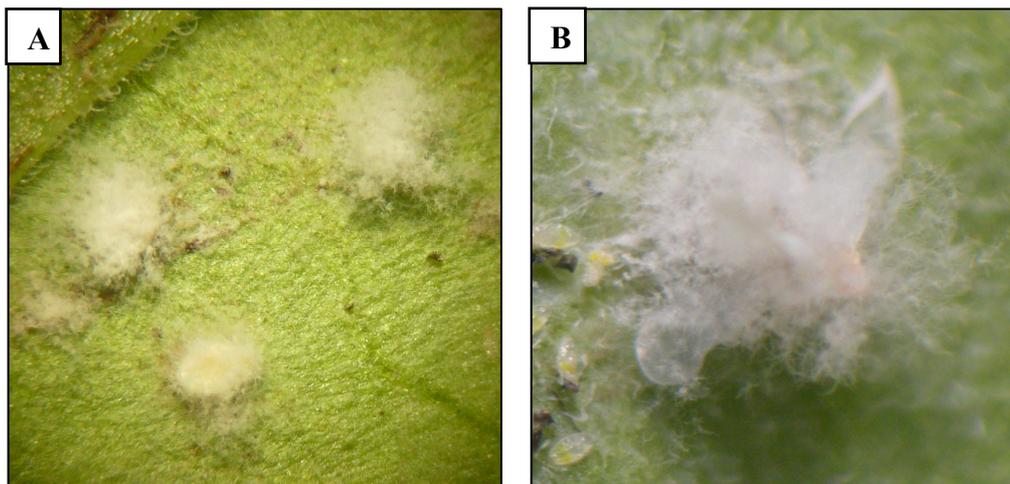


Figura 33: Ninfas y adultos de *T. vaporariorum* infectados con *I. fumosorosea* (CEP 315).

Las ninfas y los adultos de *T. vaporariorum* fueron tratados con una suspensión de 1×10^7 conidios/ml del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* y al cabo de 7 días se observó el desarrollo de micelio blanco que cubrió todo el cuerpo del insecto. **A:** Ninfas del 3° estadio infectadas. **B:** Adultos infectados.

Tabla 15: Porcentaje de mortalidad promedio de los estados de desarrollo de *T. vaporariorum* causado por el aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*.

Estados de desarrollo	Porcentaje de mortalidad*	
	CEP 315	Control
Huevos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ninfas I	9,43 (0,06)	0,00 (0,00)
Ninfas II	49,76 (0,10)	0,00 (0,00)
Ninfas III	50,27 (0,14)	0,00 (0,00)
Ninfas IV	5,66 (0,02)	0,00 (0,00)
Adultos	59,76 (0,10)	0,00 (0,00)

* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) obtenido a los 7 días posteriores a la inoculación.

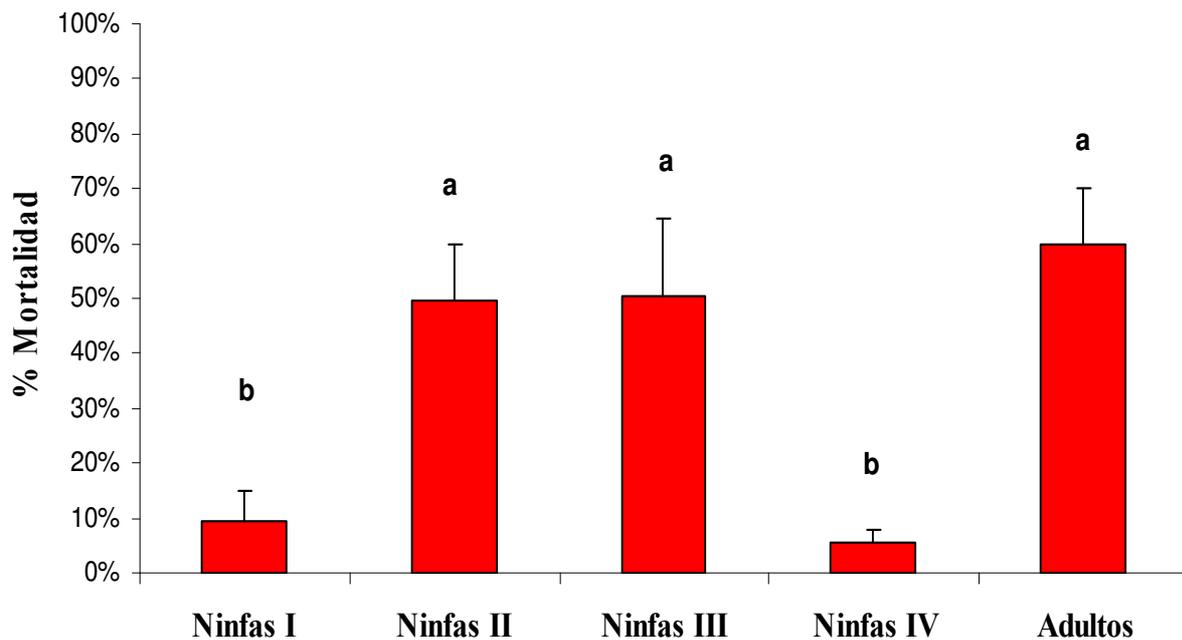


Figura 34: Susceptibilidad de los estados de desarrollo de *T. vaporariorum* al aislamientos CEP 315 de *I. fumosorosea*.

Se pulverizó el aislamiento CEP 315 sobre hojas conteniendo cada uno de los estadios inmaduros o adultos de *T. vaporariorum*. Al cabo de 7 días post-aplicación se cuantificó el número de individuos con micelio externo y se estimó el porcentaje de mortalidad promedio. Las diferencias significativas obtenidas por el Test de Tukey ($p < 0.05$) se representan con letras diferentes.

Los valores de mortalidad alcanzados para las ninfas del cuarto estadio (5,66 %) fueron notablemente inferiores a los valores obtenidos en los bioensayos anteriores para el aislamiento CEP 315 con el mismo estadio ninfal (100 %). Estas diferencias pueden atribuirse al cambio en la metodología del bioensayo, sobre todo en el método de inoculación del material fúngico (aspersión en lugar de inmersión), como así también, en las condiciones de incubación (con fotoperíodo en lugar de oscuridad).

3.3.3. Determinación de las concentraciones letales del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*

A medida que aumentó la concentración de los conidios del aislamiento CEP 315 se observó un aumento en la mortalidad de las ninfas del tercer estadio de *T. vaporariorum*, observando el valor máximo de mortalidad (100 %) con 1×10^8 conidios/ml y el valor mínimo con 1×10^4 conidios/ml (0,00 %). La CL_{50} fue de $3,14 \times 10^6$ y la CL_{90} de $1,48 \times 10^7$ conidios/ml (tabla 16), destacando que la concentración de 1×10^7 conidios/ml utilizada en todos los bioensayos fue la más adecuada.

Tabla 16: Porcentaje de mortalidad promedio y concentración letal media y noventa (CL_{50} y CL_{90}) del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*

Porcentaje de mortalidad* según la concentración de conidios					CL_{50} (conidios/ml)	CL_{90} (conidios/ml)
1×10^4 conidios/ml	1×10^5 conidios/ml	1×10^6 conidios/ml	1×10^7 conidios/ml	1×10^8 conidios/ml		
0,00 (0,00)	10,00 (0,00)	22,20 (0,00)	79,55 (0,20)	100,00 (0,00)	$3,14 \times 10^6$	$1,48 \times 10^7$

* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) obtenido a los 7 días posteriores a la inoculación.

3.3.4. Evaluación de la susceptibilidad de las ninfas de *T. vaporariorum* parasitadas con *Eretmocerus* sp. al aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*.

Otro parámetro importante a evaluar es el efecto del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* sobre parasitoides de la “mosca blanca”, con el fin de determinar la compatibilidad de los hongos entomopatógenos con los enemigos naturales.

El aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* ocasionó un porcentaje de mortalidad de las ninfas de *T. vaporariorum* sanas y parasitadas con *Eretmocerus* sp. superior al observado con el tratamiento control (tabla 17). Además, se observó que la mortalidad de las ninfas sanas (70 %) fue notablemente mayor que las ninfas parasitadas (20 %) (tabla 17), destacando que el parasitismo de los individuos de *Eretmocerus* sp. redujo la infección por *I. fumosorosea* (CEP 315).

Por otra parte, los adultos de *Eretmocerus* sp. que emergieron de las ninfas de *T. vaporariorum* no presentaron ningún síntoma de infección fúngica durante los 7 días de incubación, indicando que quizás no sean susceptibles a la infección por *I. fumosorosea* (CEP 315).

Tabla 17: Porcentaje de mortalidad de ninfas del tercer estadio de *T. vaporariorum* sanas o parasitadas con *Eretmocerus* sp.

Ninfas III de <i>T. vaporariorum</i>	Porcentaje de mortalidad*	
	CEP 315	Control
Sanas	70 (0,20)	0,00 (0,00)
Parasitadas	20 (0,06)	0,00 (0,00)

* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) obtenido a los 7 días posteriores a la inoculación.

Interacción de los aislamientos CEP 304 y CEP 315 con fungicidas comerciales

3.4.1. Efecto de los fungicidas sobre el porcentaje de germinación de CEP 304 y CEP 315.

En ambos aislamientos de *I. fumosorosea* (CEP 304 y CEP 315) se observó que el porcentaje de germinación varió significativamente entre los fungicidas y el tratamiento control ($F= 13,60$ g.l= 8 $p= 0,00001$ para CEP 304 y $F= 19,34$ g.l= 8 $p= 0,00001$ para CEP 315) (tabla 18). Al comparar el porcentaje de germinación de CEP 304 y CEP 315 para cada fungicida, se encontró que no existen diferencias significativas entre los aislamientos (tabla 18), por lo tanto el efecto de los fungicidas fue similar en los aislamientos de *I. fumosorosea*. El fungicida que redujo en mayor medida el porcentaje de germinación de CEP 304 y CEP 315 fue Azoxistrobina (21,19 % y 18,95 % respectivamente), seguido en orden decreciente por Carbendazim, Triadimefón y Procimidona. Sin embargo, los fungicidas Propamocarb, Fenarimol, Oxiclورو de Cobre y *Trichoderma harzianum* no afectaron significativamente el porcentaje de germinación de *I. fumosorosea* (figura 35).

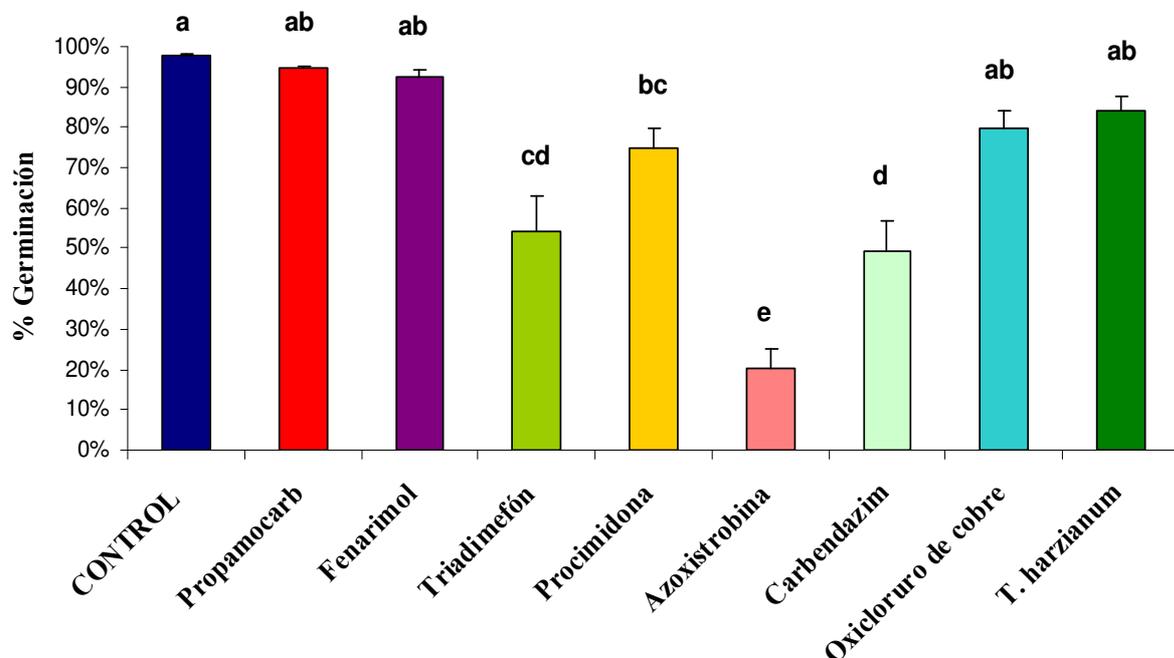
Cabe destacar que mientras se cuantificó el número de conidios germinados bajo microscopio con contraste de fases, se observó una diferencia en la longitud del tubo germinativo entre los tratamientos. El fungicida Fenarimol presentó una reducción en la longitud del tubo germinativo con respecto al control, la cual no se reflejó en el porcentaje de germinación de los conidios. El fungicida Azoxistrobina disminuyó el porcentaje de germinación significativamente, y los conidios que germinaron presentaron un tubo germinativo considerablemente menor que el tratamiento control (figura 36). Por lo tanto, los fungicidas no sólo afectaron la germinación de los conidios de *I. fumosorosea* sino también el desarrollo del tubo germinativo.

Tabla 18: Porcentaje de germinación de CEP 304 y CEP 315 en presencia de los fungicidas

Tratamiento	Porcentaje de Germinación*		Comparación entre aislamientos ⁺	
	CEP 304	CEP 315	t	p
Control	97,60 (0,005) a	98,33 (0,003) a	-1,167	0,260
Propamocarb	94,14 (0,019) ab	95,02 (0,008) ab	-0,419	0,680
Fenarimol	90,51 (0,030) ab	94,90 (0,014) ab	-1,319	0,206
Triadimefón	58,40 (0,128) cd	49,96 (0,125) d	0,472	0,644
Procimidona	66,41 (0,084) bcd	83,70 (0,028) abc	-1,951	0,069
Azoxistrobina	21,19 (0,086) e	18,95 (0,063) e	0,211	0,835
Carbendazim	36,07 (0,126) de	62,48 (0,065) cd	-1,860	0,081
Oxicloruro de cobre	85,82 (0,035) abc	73,27 (0,079) bcd	1,451	0,166
<i>T. harzianum</i>	86,81 (0,048) abc	81,60 (0,052) abc	0,737	0,472

* Porcentaje de germinación promedio (error estándar) obtenido al cabo de 24 hs. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada columna (Test de Tukey $p < 0,05$).

⁺ Comparación entre las medias de los porcentajes de germinación de CEP 304 y CEP 315 para cada fungicida (Test de Student $p < 0,05$).

**Figura 35:** Efecto de los fungicidas sobre el porcentaje de germinación de *I. fumosorosea*.

Al cabo de 24 hs de incubación se estimó el porcentaje de germinación de los conidios de *I. fumosorosea* en presencia de los fungicidas comerciales. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey $p < 0.05$).

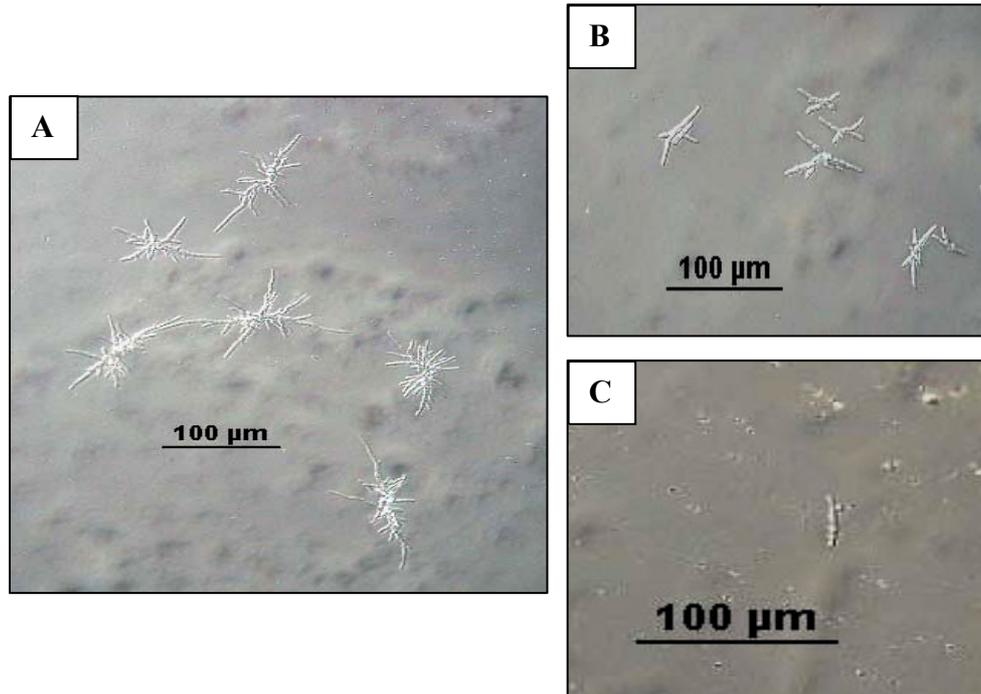


Figura 36: Observación microscópica de los conidios germinados de *I. fumosorosea*

A: Control (Tween 80 0,01 %). B: Fenarimol. C: Azoxistrobina.

3.4.2. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento radial y la tasa de crecimiento de CEP 304 y CEP 315.

En ambos aislamientos de *I. fumosorosea* (CEP 304 y CEP 315) se observó que a medida que transcurría el tiempo de incubación a 25° C el diámetro de colonia aumentó, tanto en el tratamiento control como en presencia de los ocho fungicidas comerciales (tabla 19), indicando que no existió un efecto fungistático. El diámetro de colonia obtenido luego de 10 días de incubación para cada aislamiento de *I. fumosorosea* puede observarse en las figuras 37 y 38.

Al comparar el crecimiento radial de los aislamientos CEP 304 y CEP 315 en el tratamiento control, se observó que la cepa CEP 304 presentó un crecimiento radial significativamente menor que para el aislamiento CEP 315 (test de Student $t = -2,65$ $p = 0,024$), obteniendo a los 10 días de incubación valores de diámetro de colonia de 40 mm para CEP 304 y 49,2 mm para CEP 315. Este comportamiento también se observó en la tasa de crecimiento, donde el aislamiento CEP 304 presentó un crecimiento de 3,6 mm/día y CEP 315 de 4,5 mm/día (tabla 19).

Tabla 19: Crecimiento radial y tasa de crecimiento de los aislamientos CEP 304 y CEP 315 de *I. fumosorosea* en presencia de los fungicidas comerciales

Tratamiento	CEP 304					CEP 315				
	Crecimiento radial (mm) ⁺				Tasa de crecimiento (mm/día) [*]	Crecimiento radial (mm) ⁺				Tasa de crecimiento (mm/día) [*]
	2 días	4 días	7 días	10 días		2 días	4 días	7 días	10 días	
CONTROL	11,8	25,3	34,7	40,0	3,6 (0,336) a	16,0	41,2	45,8	49,2	4,5 (0,083) a
Propamocarb	10,0	24,2	28,7	36,5	3,3 (0,394) a	15,5	40,0	45,8	48,3	4,4 (0,105) a
Fenarimol	7,7	22,5	27,3	32,8	2,9 (0,403) a	9,8	30,2	39,5	44,2	4,0 (0,239) ab
Triadimefón	8,0	21,8	26,8	35,0	3,1 (0,395) a	12,2	34,2	45,8	48,3	4,4 (0,105) a
Procimidona	8,2	25,7	31,3	35,8	3,2 (0,569) a	12,7	34,2	40,0	46,7	4,3 (0,211) a
Azoxistrobina	7,5	10,7	15,2	19,5	1,6 (0,251) a	7,7	14,5	26,7	38,8	3,5 (0,183) b
Carbendazim	5,0	5,5	7,7	8,8	0,5 (0,114) a	5,7	8,9	9,3	11,0	0,7 (0,132) c
Oxicloruro de cobre	9,3	23,5	33,2	34,2	3,0 (0,442) a	13,0	35,8	45,5	46,7	4,3 (0,167) a
<i>T. harzianum</i>	10,0	19,7	34,8	36,8	3,2 (0,349) a	13,7	37,5	44,2	45,0	4,1 (0,183) ab

⁺ Crecimiento radial promedio determinado diariamente como el diámetro de la colonia.

^{*} Tasa de crecimiento promedio (error estándar) estimada como: diámetro de colonia final (10 días) – diámetro de colonia inicial / número de días. Letras diferentes indican diferencias significativas al control dentro de la misma columna (Test de Tukey p< 0,05).

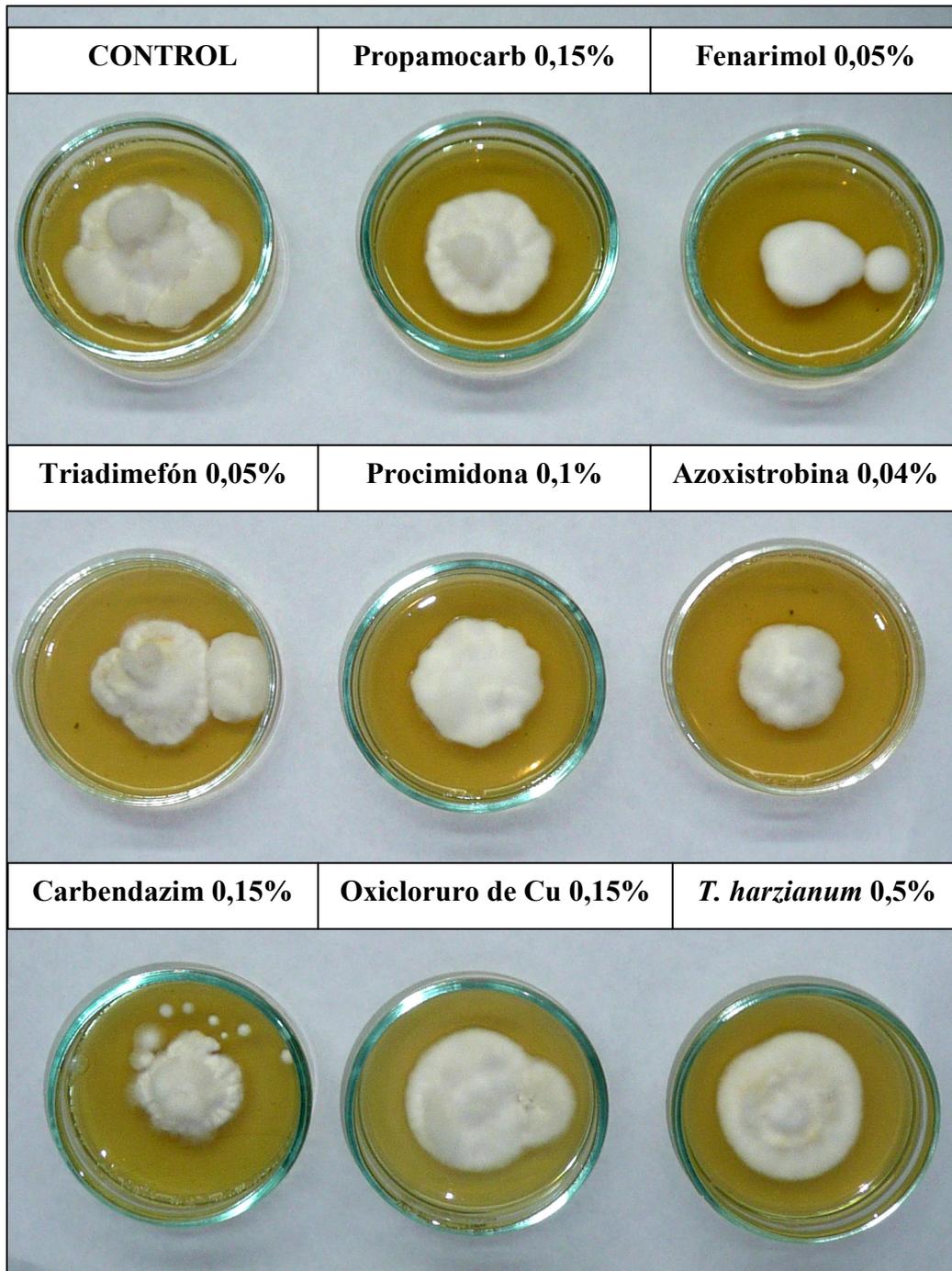


Figura 37: Crecimiento radial del aislamiento CEP 304 de *I. fumosorosea* en presencia de los fungicidas

Se colocó un cilindro de 4mm de diámetro en el centro de una cápsula de Petri conteniendo SDYA más el agregado de uno de los fungicidas o de agua destilada estéril (control). Todos los tratamientos fueron incubados a 25° C en condiciones de oscuridad por 10 días.

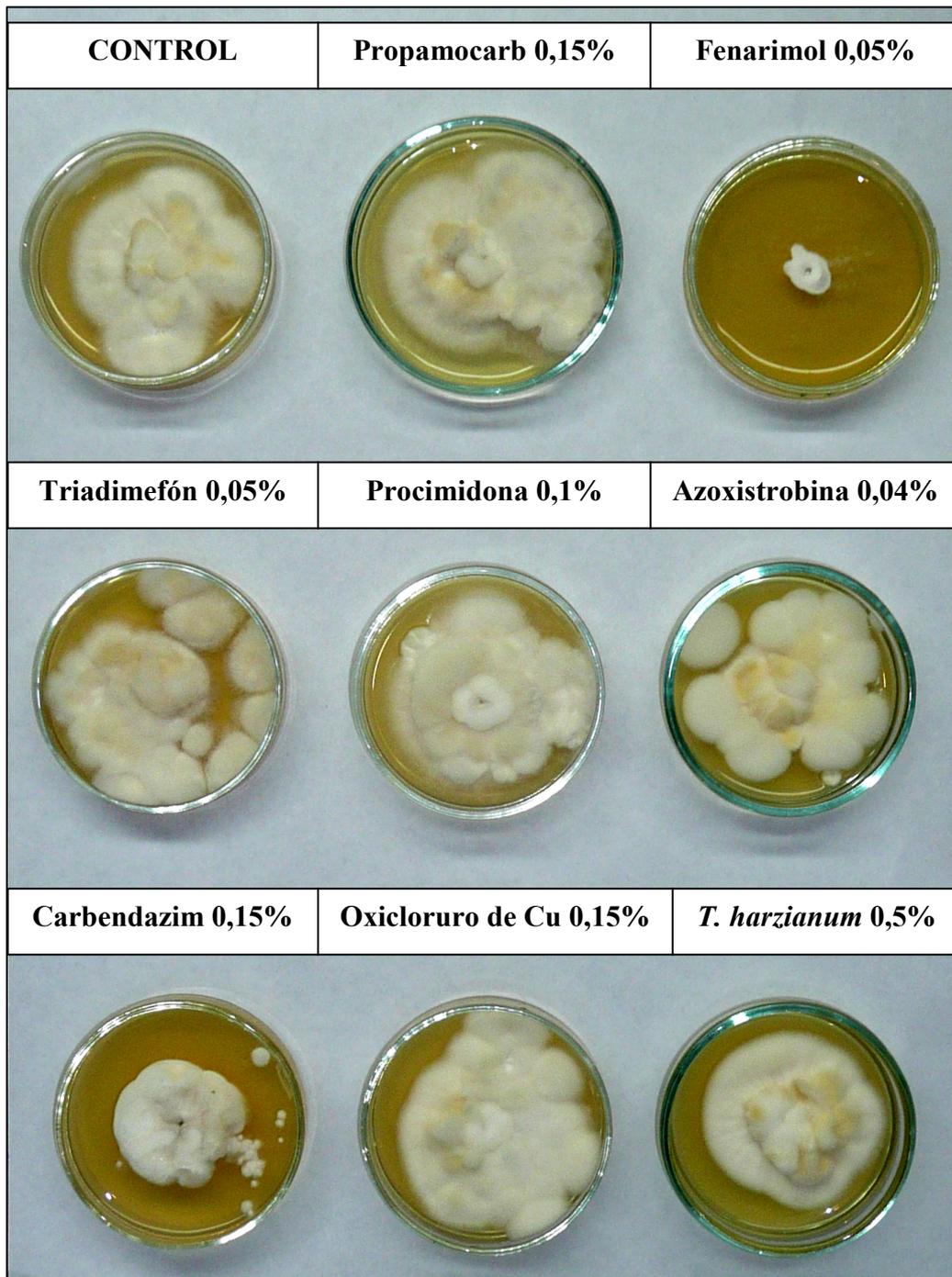


Figura 38: Crecimiento radial del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* en presencia de los fungicidas.

Se colocó un cilindro de 4mm de diámetro en el centro de una cápsula de Petri conteniendo SDYA más el agregado de uno de los fungicidas o de agua destilada estéril (control). Todos los tratamientos fueron incubados a 25° C en condiciones de oscuridad por 10 días.

En presencia de los ocho fungicidas comerciales se observó que el crecimiento radial y la tasa de crecimiento de los aislamientos CEP 304 no difirió significativamente con respecto al control (ANOVA $F= 1,55$ g.l= 8 $p= 0,157$), sin embargo se observó una tendencia a disminuir en presencia de los fungicidas Carbendazim y Azoxistrobina (tabla 19). El aislamiento CEP 315 presentó diferencias significativas en el crecimiento radial y en la tasa de crecimiento cuando fue expuesto a los fungicidas (ANOVA $F= 53,78$ g.l= 8 $p= 0,00001$), observando una reducción del 84,46 % con el fungicida Carbendazim y una reducción del 22,22 % con el fungicida Azoxistrobina (tabla 19). Por lo tanto, sólo los fungicidas Carbendazim y Azoxistrobina afectaron negativamente el crecimiento radial y la tasa de crecimiento de los aislamientos de *I. fumosorosea*.

3.4.3. Efecto de los fungicidas sobre la patogenicidad de CEP 304 y CEP 315 en ninfas de *T. vaporariorum*.

Una vez identificado que los fungicidas Propamocarb, Fenarimol, Oxiclóruo de cobre y *T. harzianum* no afectaron la germinación de los conidios ni el crecimiento de los aislamientos CEP 304 y CEP 315, se decidió evaluar el efecto de éstos sobre la patogenicidad de *I. fumosorosea*.

Los fungicidas por sí solos afectaron negativamente la supervivencia de las ninfas del cuarto estadio de *T. vaporariorum*, obteniendo valores de mortalidad entre 1,11 % a 11,11 % (tabla 20). El oxiclóruo de cobre ocasionó un cambio en la coloración de las ninfas a un color verdoso durante los primeros 2 días y luego a un color marrón al cabo de 4 días, indicando que éste producto fitosanitario penetró por la cutícula del insecto y generó su muerte. El Fenarimol afectó en menor medida a las ninfas aunque también se observó un cambio en la coloración del insecto a un color marrón luego de 2 días post-aplicación.

Al aplicar en conjunto los fungicidas con la suspensión de conidios de los aislamientos de *I. fumosorosea*, se observó que el porcentaje de mortalidad varió significativamente entre los fungicidas para CEP 304 (ANOVA $F= 4,96$ g.l= 4 $p= 0,024$) y para CEP 315 (ANOVA $F= 8,35$ g.l= 4 $p= 0,00001$) (tabla 20). Dado que no se observaron diferencias significativas entre CEP 304 y CEP 315 para cada fungicida (test de Student $t=-1,74$ $p= 0,102$) se evaluó el efecto de los fungicidas sin discriminar entre los aislamientos de *I. fumosorosea*. Los porcentajes de mortalidad fueron

significativamente menores cuando se aplicó la mezcla de cada fungicida con la suspensión de conidios en comparación con el porcentaje de mortalidad obtenido sólo con la suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (ANOVA $F= 13,35$ g.l= 4 $p= 0,00001$) (figura 39). La mezcla generada con Oxicloruro de cobre, como así también, la mezcla con Fenarimol redujo significativamente el porcentaje de mortalidad de las ninfas (49,44 % y 68,89 %, respectivamente) en comparación con el porcentaje de mortalidad de *I. fumosorosea* (84,45 %). Sin embargo, la mezcla conteniendo el Propamocarb y el fungicida biológico *T. harzianum* no afectaron significativamente el porcentaje de mortalidad de las ninfas (77,78 % y 80 %, respectivamente) (figura 39). Se puede concluir que los fungicidas Oxicloruro de cobre y Fenarimol afectaron negativamente la patogenicidad de *I. fumosorosea* sobre ninfas del cuarto estadio de *T. vaporariorum*.

Tabla 20: Porcentaje de mortalidad y tiempo letal medio de ninfas del 4° estadio de *T. vaporariorum* en presencia de los aislamientos fúngicos (CEP 304 y CEP 315) y cuatro fungicidas comerciales.

Tratamientos	Porcentaje de mortalidad*	TL ₅₀ ⁺ (días)
CONTROL	0,00 (0,00)	ND
Propamocarb	1,11 (0,011)	ND
Fenarimol	6,67 (0,033)	ND
Oxicloruro de cobre	11,11 (0,029)	ND
<i>T. harzianum</i>	3,00 (0,033)	ND
CEP 304	77,78 (0,062) a	3,94
CEP 304 + Propamocarb	76,67 (0,067) a	4,45
CEP 304 + Fenarimol	67,78 (0,057) ab	5,53
CEP 304 + Oxidloruro de cobre	44,44 (0,058) b	8,34
CEP 304 + <i>T. harzianum</i>	75,56 (0,047) a	3,49
CEP 315	91,11 (0,045) a	2,9
CEP 315 + Propamocarb	78,89 (0,045) ab	3,66
CEP 315 + Fenarimol	70,00 (0,050) bc	5,02
CEP 315 + Oxidloruro de cobre	54,44 (0,041) c	6,98
CEP 315 + <i>T. harzianum</i>	82,22 (0,049) ab	3,29

* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) a los 7 días post-incubación. Las letras representan las diferencias significativas obtenidas para cada aislamiento (CEP 304 o CEP 315) mediante un test de Tukey ($p < 0,05$).

⁺ Tiempo letal determinado mediante el programa Micro Probit

ND: dato no determinado.

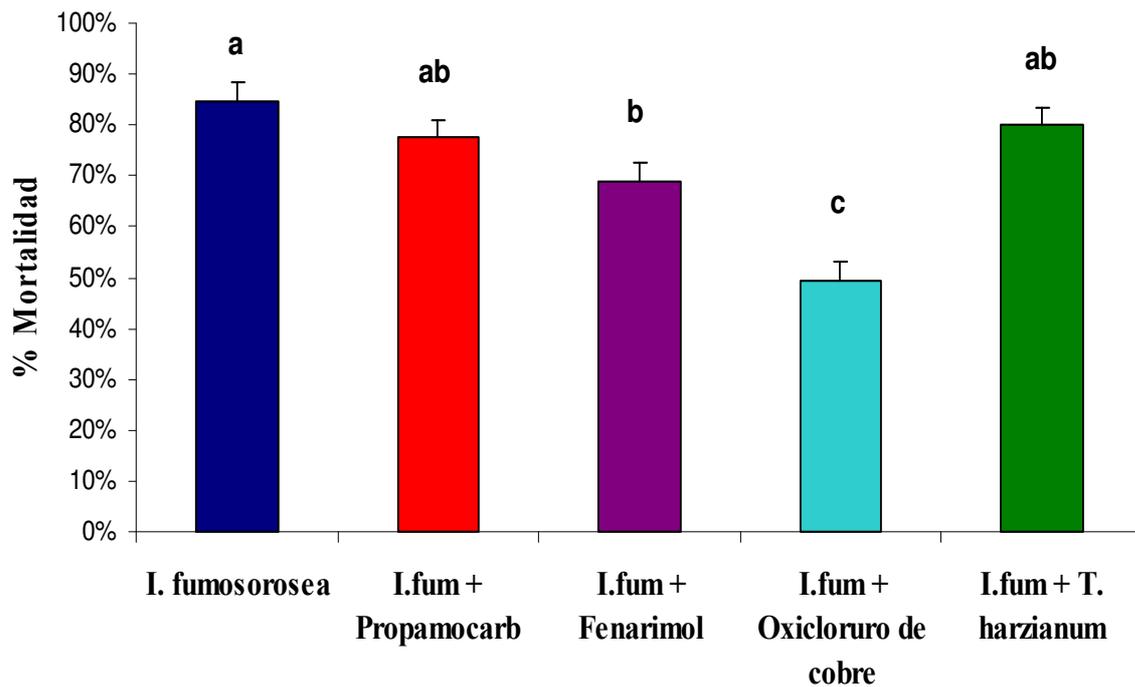


Figura 39: Porcentaje de mortalidad de *I. fumosorosea* sobre ninfas de *T. vaporariorum* en presencia de 4 fungicidas comerciales.

Se extrajeron ninfas del 4° estadio de *T. vaporariorum* de una colonia establecida en el laboratorio y se dispusieron en grupo de a 10 individuos sobre portaobjetos estériles. En cada individuo se aplicó una gota (3 μ l) de una suspensión de 1×10^7 conidios/ml de *I. fumosorosea* o una mezcla conteniendo volúmenes iguales de cada fungicida y la suspensión de conidios. Todos los tratamientos fueron conservados en cámara incubadora a 25° C con un fotoperíodo de 12hs luz y 12hs oscuridad durante 7 días. Una vez transcurrido el período de incubación se estimó el porcentaje de mortalidad promedio para cada tratamiento. “I.fum” corresponde a la abreviatura de *I. fumosorosea*. Las barras representan el porcentaje de mortalidad promedio y el error estándar. Las letras representan las diferencias significativas obtenidas mediante un test de Tukey ($p < 0,05$).

Producción masiva de *I. fumosorosea* (CEP 315) y su aplicación en cultivos hortícolas

3.5.1. Selección de sustratos de producción masiva de *I. fumosorosea* (CEP 315)

El primer paso en la etapa de elaboración de un agente microbiano consistió en la selección del sustrato más adecuado para la multiplicación de *I. fumosorosea* (CEP 315). Para ello se evaluó el rendimiento de biomasa fúngica en 6 sustratos diferentes: arroz parboil, arroz integral, arroz yamaní, arroz rojo (granos de *Oryza sativa*), trigo (granos de *Triticum aestivum*) y salvado de trigo (cubierta interna del grano de *Triticum aestivum*). En la tabla 21 se indica el rendimiento de conidios por gramo de sustrato y el porcentaje de germinación de los conidios para cada sustrato.

Tabla 21: Rendimiento y porcentaje de germinación en cada sustrato de producción masiva.

Sustratos	Días	Rendimiento*	Germinación (%) ⁺
Arroz Parboil	10	0,51 x 10 ⁸ (0,18)	98,02 (0,80)
	20	1,13 x 10 ⁸ (0,44)	98,42 (0,72)
	30	2,13 x 10 ⁸ (1,21)	99,21 (0,14)
Arroz Integral	10	1,99 x 10 ⁸ (0,63)	99,51 (0,12)
	20	6,67 x 10 ⁸ (2,24)	99,09 (0,31)
	30	8,23 x 10 ⁸ (2,99)	98,72 (0,37)
Arroz Yamaní	10	1,39 x 10 ⁸ (0,49)	97,08 (2,14)
	20	0,87 x 10 ⁸ (0,34)	99,18 (0,32)
	30	3,63 x 10 ⁸ (0,63)	99,64 (0,22)
Arroz Rojo	10	0,33 x 10 ⁸ (0,23)	99,60 (0,25)
	20	1,57 x 10 ⁸ (1,17)	99,71 (0,18)
	30	2,77 x 10 ⁸ (0,71)	99,54 (0,29)
Trigo	10	1,20 x 10 ⁸ (0,52)	99,29 (0,24)
	20	3,73 x 10 ⁸ (1,74)	98,00 (0,60)
	30	1,50 x 10 ⁸ (0,60)	93,47 (5,12)
Salvado de trigo	10	0,42 x 10 ⁸ (0,19)	97,41 (1,61)
	20	0,31 x 10 ⁸ (0,10)	93,51 (3,10)
	30	1,75 x 10 ⁸ (0,75)	98,77 (0,08)

* Rendimiento promedio (error estándar) representado como cantidad de conidios por gramo de sustrato.

⁺ Porcentaje de germinación promedio (error estándar) obtenido al cabo de 24hs.

En la mayoría de los sustratos, a partir de los 7 días de incubación a 25° C, se observó el desarrollo de un micelio de color blanco correspondiente a *I. fumosorosea* (CEP 315) y, luego de 10 días, se observó la formación de estructuras reproductivas (conidios). Al cabo de 20 días, se obtuvo la colonización completa de los sustratos observando la formación de grumos constituidos por micelio y los granos del sustrato. Cabe destacar, que en el salvado de trigo se observó una cantidad reducida de micelio y una colonización parcial del sustrato.

Para evaluar si existe una interacción entre los valores de rendimiento de cada sustrato y los días de incubación, se realizó un ANOVA de dos vías, donde el factor “día de incubación” fue considerado como 3 mediciones independientes. Los resultados del ANOVA indicaron que existen diferencias significativas en cada uno de los factores (“sustratos” y “días”) pero no existe interacción entre ambos factores (tabla 22), por lo tanto, en los análisis subsiguientes cada factor fue analizado por separado.

Tabla 22: ANOVA de dos vías entre los valores de rendimiento de los sustratos y los días de incubación.

Factor	F	g.l.	p
Sustratos	5,01	5; 70	0,001
Días (10, 20, 30)	5,73	2; 70	0,005
Sustratos x Días	0,97	10; 70	0,475

Las diferencias significativas entre los rendimientos de cada sustrato para cada tiempo de incubación se determinaron mediante un ANOVA y un test de Tukey, o en el caso que no se encontró homocedasticidad, se realizó un test no paramétrico Kruskal – Wallis y un test tipo Tukey. A los 10 días de incubación no se observaron diferencias significativas entre los sustratos (ANOVA F= 1,88 g.l= 5,25 p= 0,13). Sin embargo, a los 20 días de incubación los valores de rendimiento fueron estadísticamente diferentes (test Kruskal-Wallis H (5, N= 38) = 13,59, p= 0,02), observando el mayor rendimiento en el arroz integral ($6,67 \times 10^8$ conidios/gr sustrato), seguido en orden decreciente por trigo ($3,73 \times 10^8$ conidios/gr sustrato), arroz rojo ($1,57 \times 10^8$ conidios/gr sustrato), arroz parboil ($1,13 \times 10^8$ conidios/gr sustrato), arroz yamaní ($0,87 \times 10^8$ conidios/gr sustrato) y salvado de trigo ($0,31 \times 10^8$ conidios/gr sustrato) (tabla 21). Los valores de

rendimiento a los 30 días de incubación no mostraron diferencias significativas cuando se realizó un ANOVA excluyendo los valores de arroz yamaní y salvado por falta de repeticiones ($F= 2,47$ g.l= 3,11 $p= 0,12$) (figura 40).

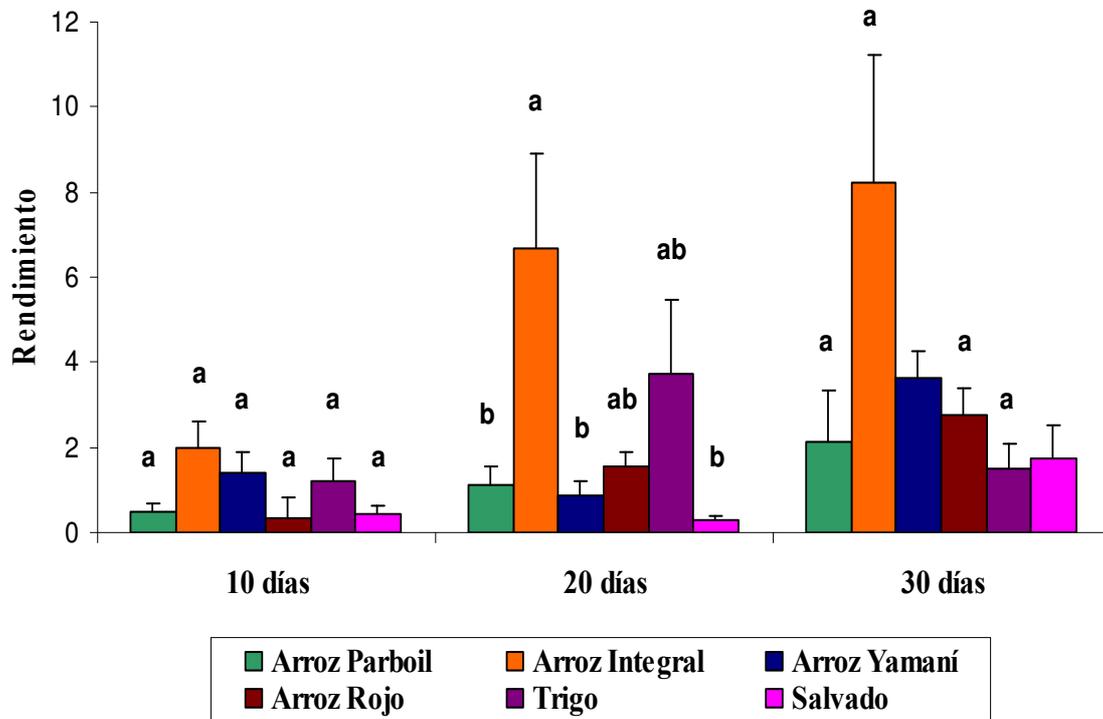


Figura 40: Rendimiento de conidios por gramo de sustrato según los días de incubación

A los 10, 20, 30 días se determinó el rendimiento promedio como el número de conidios por gramo de sustrato. Los valores representados en el eje y corresponde a valores con exponente 10^8 . Las letras representan las diferencias significativas ($p < 0,05$) obtenidas en cada sustrato para cada tiempo de incubación (test no paramétrico tipo Tukey). Las barras que no presentan letras no fueron incluidas en los análisis estadísticos.

Los valores de los porcentajes de germinación fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías con el fin de determinar si existe interacción entre los sustratos y los días de incubación. Los resultados indicaron que sólo existen diferencias significativas entre los sustratos ($F= 4,55$ g.l= 5,87 $p= 0,001$) (tabla 23), por lo tanto, los valores de los porcentajes de germinación en cada período de tiempo fueron agrupados y en los análisis subsiguientes fueron estimados sin discriminar por día de incubación.

Tabla 23: ANOVA de dos vías para los valores de germinación de los sustratos y los tiempos de incubación.

Factor	F	g.l.	p
Sustratos	4,55	5; 87	0,001
Días (10, 20, 30)	0,08	2; 87	0,92
Sustratos x Días	1,83	10; 87	0,07

Al analizar los porcentajes de germinación para cada sustrato mediante un ANOVA, se encontró que los valores diferían significativamente ($F= 4,96$ g.l= 5,99 $p= 0,0004$), observando el mayor porcentaje de germinación en el arroz rojo (99,63 %), seguido en orden decreciente por arroz integral (99,14 %), arroz yamaní (98,72 %), arroz parboil (98,56 %), trigo (97,46 %) y salvado de trigo (95,98 %) (figura 41). Cabe destacar que en todos los sustratos el porcentaje de germinación fue superior al 95% indicando que la producción masiva de CEP 315 de *I. fumosorosea* no afecto la viabilidad de los conidios.

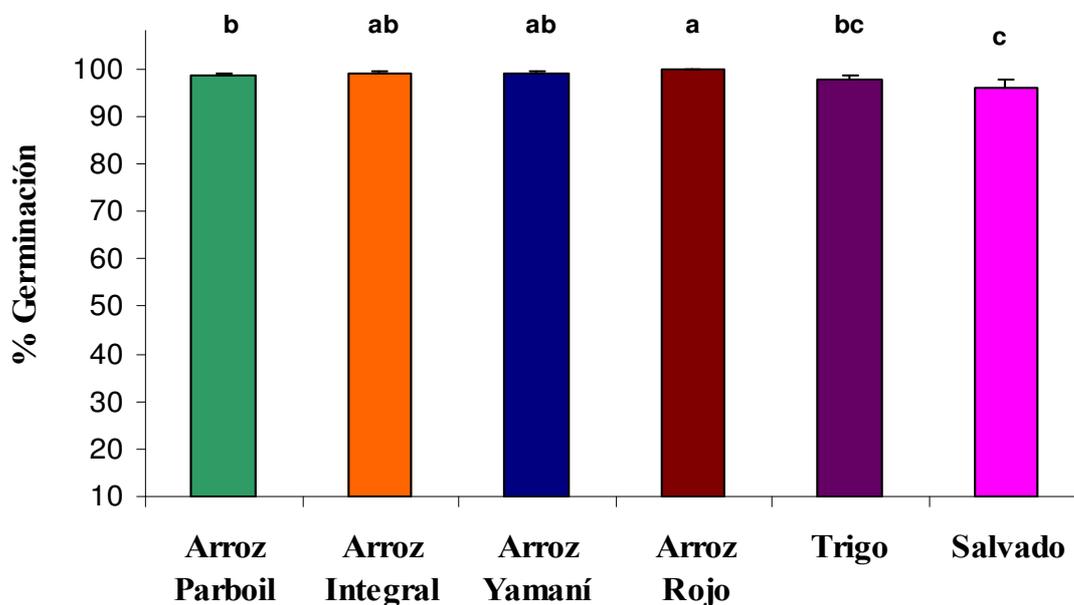


Figura 41: Porcentaje de germinación para cada sustrato de producción masiva.

Se cuantificó el porcentaje de germinación promedio en cada sustrato luego de incubar los conidios a 25° C por 24 hs. Las letras representan las diferencias significativas obtenidas con un test de Tukey ($p < 0,05$).

En función de los resultados expuestos, se puede indicar que la producción masiva del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* en granos de arroz originó valores de rendimiento y germinación superiores que en trigo y salvado, por lo tanto, el arroz sería el sustrato más adecuado para el desarrollo de *I. fumosorosea*. Por lo tanto, se seleccionó el arroz parboil como sustrato de producción masiva por ser el más económico entre todas las variedades de arroz.

A continuación, se determinó el tiempo óptimo de incubación a 25° C para lograr el mayor rendimiento y elevada viabilidad de los conidios. Para ello, se inocularon bolsas de arroz parboil con una suspensión de conidios 1×10^6 conidios/ml del aislamiento CEP 315 y se conservaron en cámara incubadora a 25° C durante 15, 20, 25, 30 y 35 días.

A medida que transcurría el tiempo de incubación, se observó la presencia de abundante micelio blanco sobre los granos de arroz y el posterior desarrollo de conidios que cambiaron la coloración de los granos a un color rosado-grisáceo (figura 42).



Figura 42: Desarrollo de estructuras fúngicas de *I. fumosorosea* sobre los granos de arroz.

Producción masiva de CEP 315 en bolsas de polipropileno con arroz parboil en cámara incubadora a 25° C en condiciones de oscuridad. Al cabo de 15 días (izquierda) o 25 días (derecha) de incubación se extrajo una pequeña cantidad de arroz de las bolsas de polipropileno y se observó el desarrollo de estructuras fúngicas sobre los granos.

Al analizar los valores de rendimiento de conidios por gramo de arroz en cada período de incubación, no se encontraron diferencias significativas ($F= 1,21$ g.l= 4,9 $p= 0,37$), sin embargo, se observó una tendencia de aumento a medida que transcurrió el tiempo de incubación (tabla 24). El valor máximo de rendimiento se alcanzó a los 25 días de incubación, donde se obtuvo $11,50 \times 10^8$ conidios por gramo de arroz. Cabe destacar que en el ensayo de selección de sustratos, los valores de rendimiento del arroz parboil fueron menores que los obtenidos en este ensayo (tabla 21 y 24), lo cual puede deberse a que durante este ensayo se cambió de marca comercial del arroz parboil.

Los valores de porcentaje de germinación no presentaron diferencias significativas entre los días de incubación (test Kruskal – Wallis H (4, N=24)= 8,03, $p= 0,09$), sin embargo, se observó una tendencia a aumentar hacia el día 30 y luego disminuir a partir de los 35 días de incubación (tabla 24). Estos valores de germinación son similares a los obtenidos anteriormente en el ensayo de selección de sustratos, en donde también se observó una tendencia de aumento del porcentaje de germinación hacia los 30 días (tabla 21).

Tabla 24: Rendimiento y porcentaje de germinación de *I. fumosorosea* CEP 315 en función del tiempo de incubación.

Días de incubación	Rendimiento *	Germinación ⁺
15 días	$4,64 \times 10^8$ (3,01) a	98,60 % (0,33) a
20 días	$4,81 \times 10^8$ (1,84) a	98,58 % (0,39) a
25 días	$11,50 \times 10^8$ (3,22) a	98,66 % (0,23) a
30 días	$9,44 \times 10^8$ (4,77) a	98,92 % (0,09) a
35 días	$9,24 \times 10^8$ (3,36) a	95,62 % (0,21) a

* Rendimiento promedio (error estándar) representado como cantidad de conidios por gramo de sustrato.

⁺ Porcentaje de germinación promedio (error estándar) obtenido al cabo de 24hs.

Letras representan las diferencias significativas dentro de cada columna según el test de Tukey ($p < 0,05$).

A modo de resumen de los resultados expuestos hasta el momento, se podría inferir que el sustrato adecuado para la producción masiva del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* es el arroz y que el tiempo óptimo de incubación a 25° C en condiciones de oscuridad es de 25 días.

3.5.2. Elaboración de una suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) a partir de la producción masiva (S.C.P.M)

Con el fin de elaborar un agente microbiano a base de *I. fumosorosea*, se llevo a cabo la multiplicación masiva del aislamiento CEP 315 en granos de arroz parboil y el procesamiento de dicho sustrato hasta conseguir una suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315). A ésta suspensión se la denominó como “S.C.P.M” para diferenciarla de la suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) obtenida a partir de cultivos fúngicos en medio agarizado (“S.C.M.A”).

Durante la producción masiva del aislamiento CEP 315 se obtuvo un rendimiento de $10,44 \times 10^8$ conidios/gramo de arroz, y luego de los pasos de lavado y filtrado del sustrato, la S.C.P.M presentó una concentración de $5,89 \times 10^8$ conidios/ml y un porcentaje de germinación de los conidios del 98,68 %. Estos valores se aproximaron al porcentaje de germinación del aislamiento CEP 315 proveniente de cultivos fúngicos en medio agarizado (S.C.M.A) (sección 3.2.3, tabla 11), lo cual indicaría que el procedimiento llevado a cabo para la elaboración S.C.P.M no afectó la viabilidad de los conidios de *I. fumosorosea*.

Una vez obtenida la suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315), se decidió evaluar el tiempo que puede ser almacenada en la heladera (a 4° C) sin que afecte la viabilidad de los conidios y por lo tanto, su potencial patogenicidad. Para ello, la S.C.P.M fue preservada a 4° C durante de 10, 15, 30 y 40 días y se midió el porcentaje de germinación de los conidios en cada uno de los tiempos.

A medida que aumentó el tiempo de preservación en la heladera se observó una reducción en el porcentaje de germinación de los conidios de S.C.P.M, alcanzando valores significativamente menores luego de 40 días ($F= 8,87$ g.l= 4, 5 $p= 0,017$) (tabla 25). Sin embargo, cuando se preservaron por 90 días las bolsas de polipropileno conteniendo la biomasa fúngica (previo al procesamiento de los granos de arroz) se obtuvo un 98 % de germinación. Estos resultados indican que la viabilidad de los

conidios se ve afectada cuando éstos se encuentran en un medio líquido y no cuando están presentes sobre los granos de arroz. Por lo tanto, se aconsejaría que las bolsas de producción masiva sean preservadas por no más de 90 días y que el procesamiento de los granos de arroz para la elaboración de la S.C.P.M. se realice el momento de su utilización.

Tabla 25: Porcentaje de germinación de la S.C.P.M de *I. fumosorosea* (CEP 315) durante la preservación a 4° C.

Días de preservación	Germinación (%)*
Cosecha de conidios	98,87 (0,004) a
10 días	95,05 (0,014) a
15 días	94,22 (0,016) a
30 días	88,23 (0,080) ab
40 días	63,70 (0,070) b

* Porcentaje de germinación promedio (error estándar) obtenido al cabo de 24 hs de incubación. Las letras representan las diferencias significativas obtenidas mediante un test de Tukey ($p < 0,05$).

3.5.3. Susceptibilidad de individuos de *T. vaporariorum* a la S.C.P.M de *I. fumosorosea* (CEP 315)

La S.C.P.M de *I. fumosorosea* (CEP 315) ocasionó la infección de todos los estados de desarrollo de *T. vaporariorum*, excepto los huevos, observando el desarrollo de un micelio blanco con aspecto algodonoso que cubrió todo el cuerpo del insecto. Los porcentajes de mortalidad máximos fueron observados en las ninfas del primer y segundo estadio (24,42 % y 25,31 %, respectivamente) y el porcentaje de mortalidad mínimo en ninfas del cuarto estadios (8,86 %) (tabla 26). Al analizar los porcentaje de mortalidad de cada estado de desarrollo (excluyendo los huevos), se observó que los valores no difirieron significativamente ($F= 0,27$ $g.l= 4,20$ $p= 0,89$) (figura 43), destacando que todos los estadios ninfales y adultos de *T. vaporariorum* son igualmente susceptibles a la S.C.P.M de *I. fumosorosea* (CEP 315).

Tabla 26: Porcentaje de mortalidad promedio del S.C.M.A, S.C.P.M y del tratamiento control para cada estado de desarrollo de *T. vaporariorum*.

Estadios	Porcentaje de mortalidad*		
	S.C.M.A	S.C.P.M	Control
Huevos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ninfas I	9,43 (0,06)	24,42 (0,08)	0,00 (0,00)
Ninfas II	49,76 (0,10)	25,31 (0,11)	0,00 (0,00)
Ninfas III	50,27 (0,14)	10,46 (0,05)	0,00 (0,00)
Ninfas IV	5,66 (0,02)	8,86 (0,04)	0,00 (0,00)
Adultos	59,76 (0,10)	12,50 (0,04)	0,00 (0,00)

*Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) obtenido a los 7 días posteriores a la inoculación.

S.C.M.A: suspensión de 1×10^7 conidios/ml de CEP 315 proveniente de cultivos fúngicos en medio agarizado.

S.C.P.M: suspensión de 1×10^7 conidios/ml de CEP 315 proveniente de la producción en granos de arroz.

Control: Tween 80 0,01 % (v/v).

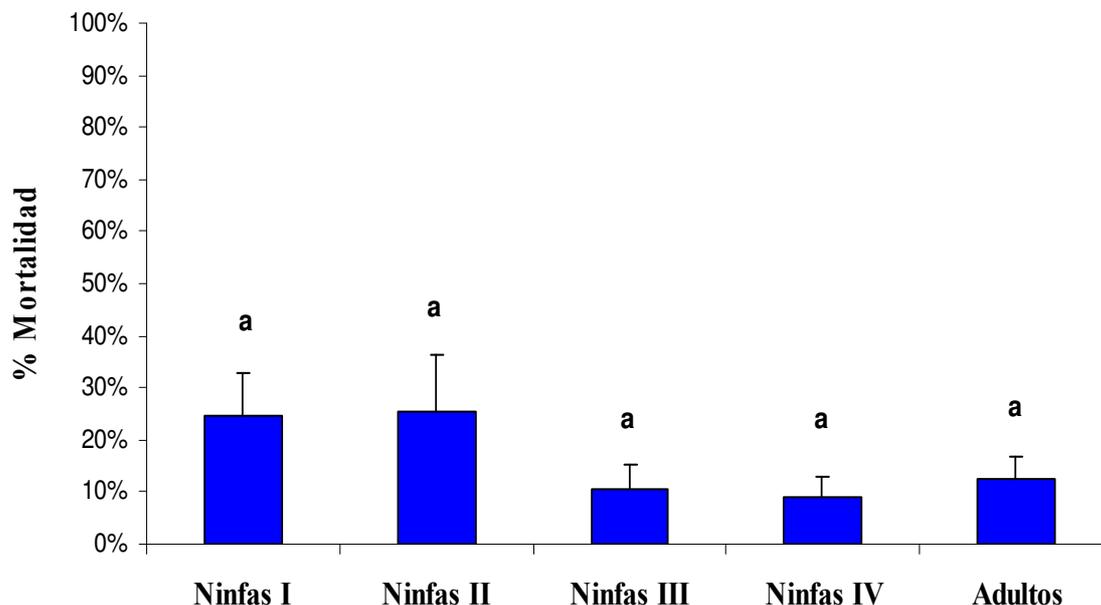


Figura 43: Susceptibilidad de los estados de desarrollo de *T. vaporariorum* a la S.C.P.M de *I. fumosorosea* (CEP 315).

Se pulverizó la S.C.P.M (1×10^7 conidios/ml) sobre hojas conteniendo los estadios inmaduros o adultos de *T. vaporariorum*. Al cabo de 7 días posteriores a la inoculación, se cuantificó el número de individuos infectados y se estimó el porcentaje de mortalidad promedio. Las letras representan las diferencias significativas obtenidas por el test de Tukey ($p < 0.05$).

Los valores de mortalidad obtenidos con la S.C.P.M fueron comparados con los datos de mortalidad de la S.C.M.A para determinar si los procedimientos realizados en la producción masiva afectaron la virulencia de los conidios del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*. Mediante un test no paramétrico Mann-Whitney se observó que existen diferencias significativas entre la mortalidad promedio de S.C.M.A (34,98 %) y S.C.P.M (16,31 %) ($U= 339$ $Z= 2,29$ $p= 0,02$) (figura 44). La mayor diferencia entre las suspensiones de conidios se encontró en las ninfas del tercer estadio donde el porcentaje de mortalidad fue significativamente mayor en presencia de la S.C.M.A que con la S.C.P.M ($F= 7,90$ $g.l= 1,10$ $p= 0,02$) (tabla 26 y figura 45). Asimismo, se decidió evaluar si existía interacción entre la mortalidad de los tratamientos (S.C.M.A y S.C.P.M) y los estados de desarrollo, para lo cual se llevo a cabo un ANOVA de dos vías (excluyendo los datos para huevos). Los resultados mostraron que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p= 0,03$), y que ambos factores presentan una interacción ($p= 0,03$) (tabla 27). El porcentaje de mortalidad de los adultos (59,76 %) presentó diferencias significativas en comparación con las ninfas del primer (9,43 %) ($p= 0,01$) y cuarto estadio (5,66 %) ($p= 0,02$) cuando fueron inoculados con S.C.M.A, como así también, con las ninfas del tercer estadio cuando se inoculó con la S.C.P.M (10,46 %) ($p= 0,03$) (figura 45).

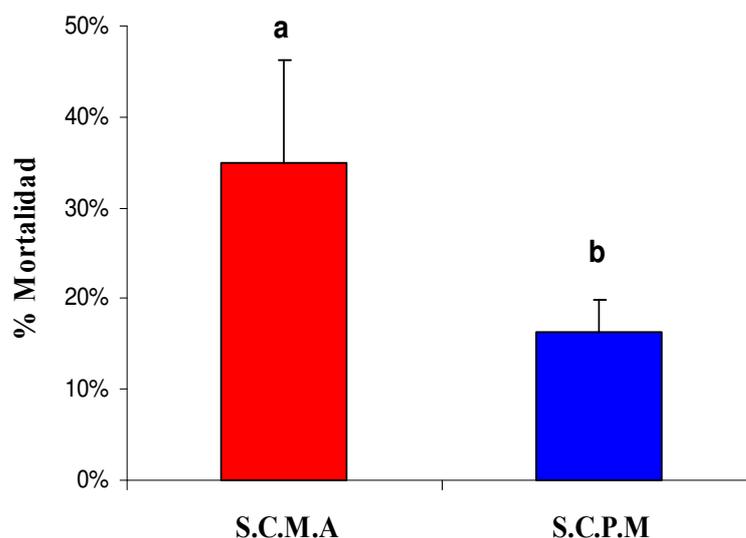


Figura 44: Porcentaje de mortalidad de la S.C.M.A y S.C.P.M sobre individuos de *T. vaporariorum*.

Porcentaje de mortalidad promedio y error estándar obtenido a los 7 días posteriores a la inoculación de la S.C.M.A y S.C.P.M sobre individuos de *T. vaporariorum*. Las letras representan las diferencias significativas obtenidas por el test Mann – Whitney ($p < 0,05$).

Tabla 27: Análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías entre los valores de mortalidad de los tratamientos (S.C.M.A y S.C.P.M) y los estados de desarrollo.

Factor	F	g.l.	p
Tratamientos (S.C.M.A y S.C.P.M)	4,93	1; 56	0,03
Estados de desarrollo	2,07	4; 56	0,10
Interacción entre factores	2,96	4; 56	0,03

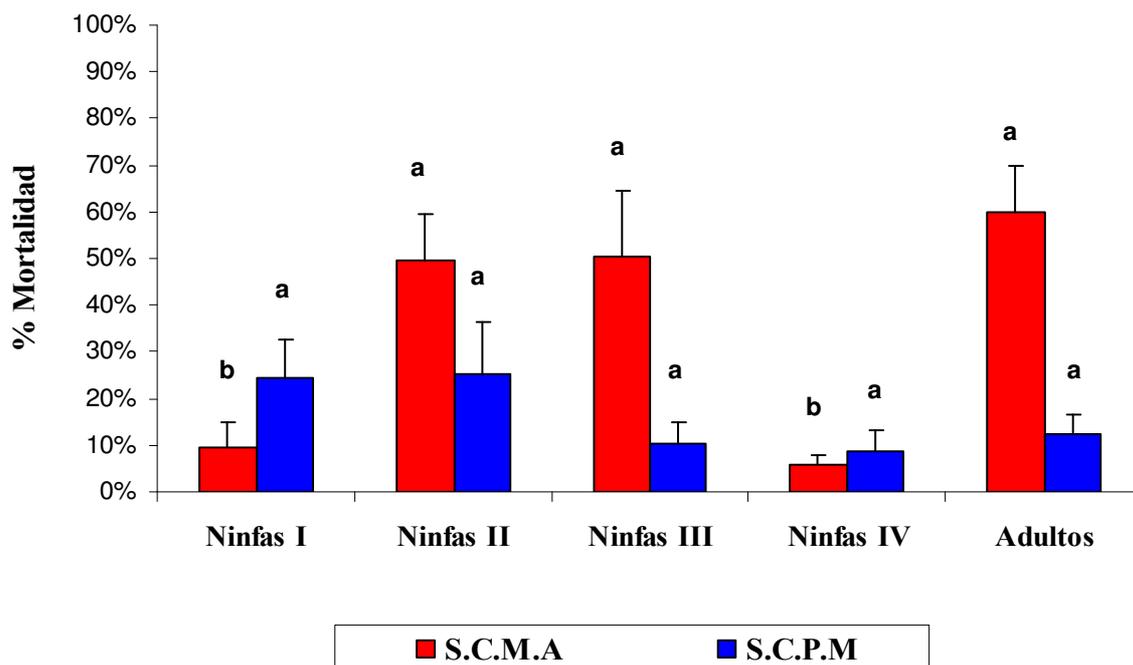


Figura 45: Susceptibilidad de los estados de desarrollo de *T. vaporariorum* a la S.C.M.A y la S.C.P.M del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*

Se pulverizó la S.C.M.A y la S.C.P.M del aislamiento CEP 315 sobre hojas conteniendo los estadios inmaduros o adultos de *T. vaporariorum*. Al cabo de 7 días post-inoculación se cuantificó el número de individuos infectados y se estimó el porcentaje de mortalidad promedio. Letras en las barras del mismo color corresponden a las diferencias significativas obtenidas por el test de Tukey ($p < 0.05$).

En función de todos los resultados se puede destacar que la S.C.P.M de *I. fumosorosea* (CEP 315) infectó todos los estadios ninfales y adultos de *T. vaporariorum* en condiciones de laboratorio. Sin embargo, los valores de mortalidad de la S.C.P.M fueron significativamente menor que los valores de S.C.M.A, indicando que la producción en granos de arroz afectó la patogenicidad de los conidios de *I. fumosorosea*.

Por otra parte, se determinó la concentración letal de la S.C.P.M capaz de causar una mortalidad del 50 % y 90 % de los individuos de *T. vaporariorum* bajo condiciones controladas de laboratorio. En estas pruebas de patogenicidad se observó que a medida que aumentó la concentración de la S.C.P.M se observó un aumento en la mortalidad de las ninfas de *T. vaporariorum*, obteniendo el 100 % de mortalidad con 1×10^8 conidios/ml y el 15,38 % con 1×10^4 conidios/ml (tabla 28). Mediante el programa Micro Probit se estimó que la CL_{50} fue de $1,26 \times 10^6$ conidios/ml y que la CL_{90} fue de $3,58 \times 10^7$ conidios/ml. Al comparar estos valores con los obtenidos con S.C.M.A, se observó que la CL_{90} fue mayor para S.C.P.M (tabla 28), lo cual puede deberse a su baja patogenicidad para las ninfas del tercer estadio de *T. vaporariorum*.

Tabla 28: Determinación de la concentración letal 50 y 90 de la S.C.M.A y de la S.C.P.M del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*.

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad* según la concentración de conidios					CL_{50} (conidios/ml)	CL_{90} (conidios/ml)
	1×10^4 conidios/ml	1×10^5 conidios/ml	1×10^6 conidios/ml	1×10^7 conidios/ml	1×10^8 conidios/ml		
S.C.M.A	0,00 (0,00)	10,00 (0,00)	22,20 (0,00)	79,55 (0,20)	100 (0,00)	$3,14 \times 10^6$	$1,48 \times 10^7$
S.C.P.M	15,38 (0,00)	16,67 (0,00)	17,50 (0,08)	85,79 (0,12)	100 (0,00)	$1,26 \times 10^6$	$3,58 \times 10^7$

* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) obtenido a los 7 días posteriores a la inoculación.

S.C.M.A: suspensión de conidios de CEP 315 proveniente de cultivos fúngicos en medio agarizado.

S.C.P.M: suspensión de conidios de CEP 315 proveniente de la producción masiva.

3.5.4. Aplicación de la S.C.P.M de *I. fumosorosea* (CEP 315) en cultivos hortícolas

Una vez obtenido la S.C.P.M. del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* y evaluada su patogenicidad en condiciones de laboratorio, se decidió determinar su patogenicidad sobre poblaciones de “mosca blanca” presentes en cultivos hortícolas bajo cubierta.

Durante el desarrollo del ensayo de patogenicidad se observó la presencia de las dos especies de “mosca blanca” de mayor importancia económica (*B. tabaci* y *T. vaporariorum*) en las plantaciones de tomate y berenjena. Además, se observó la

presencia de otros insectos plagas como los “trips” (Insecta: Thysanoptera) y los “pulgonos” (Hemiptera: Aphididae).

Durante el desarrollo del ensayo a campo se registró una temperatura promedio de 13° C, con máximas de 21° C y mínimas de 7° C, y la humedad relativa del ambiente fue de 74 % oscilando entre 64 % y 83 % (tabla 29 y 30).

En las plantaciones de tomate (variedad Elphida), la población de “mosca blanca” fluctuó a lo largo del mes de mayo alcanzando un valor promedio de 1945 individuos en un total de 10 plantas (figura 46 A). La población de individuos de “mosca blanca” no presentó diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA $F= 0,94$ g.l=6 $p=0,4142$), registrando un valor promedio de 2108,3 individuos, 2114,5 individuos y 1612,8 individuos en la parcela control, S.C.P.M (1×10^7 conidios/ml) y S.C.P.M (1×10^8 conidios/ml), respectivamente.

En las dos parcelas de la plantación de tomate donde se aplicó la S.C.P.M se observó la presencia de individuos de “mosca blanca” infectados con *I. fumosorosea* (tabla 30), obteniendo un total de 175 individuos infectados en la parcela con S.C.P.M (1×10^7 conidios/ml) y 240 individuos en la parcela con la S.C.P.M (1×10^8 conidios/ml). La presencia de individuos infectados se observó a partir del cuarto día post-aplicación (18/05/2009) y continuó hasta los 15 días posteriores a la inoculación (29/05/2009) (tabla 29). Los adultos de “mosca blanca” se observaron infectados en los primeros días posteriores a la aplicación (cuarto día) y las ninfas a partir del octavo día (figura 47 A). En la parcela donde se aplicó la S.C.P.M (1×10^7 conidios/ml) se observó la mayor cantidad de adultos infectados al sexto día post-aplicación (20/05/2009), correspondiendo a un 5 % de infección. Sin embargo, el mayor número de ninfas infectadas se observó a los 8 días (22/05/2009) con un porcentaje de infección del 6 % (figura 47 A). En la parcela donde se pulverizó la S.C.P.M (1×10^8 conidios/ml) se observó el mayor porcentaje de adultos y ninfas infectadas al octavo día post-inoculación, obteniendo un 9,20 % y 8,20 % de infección, respectivamente (figura 47 A). Por lo tanto, se puede destacar que a mayor concentración de S.C.P.M mayor porcentaje de individuos de “mosca blanca” infectados, observando el pico de infección a los 8 días posteriores a la aplicación.

Tabla 29: Número de individuos de “mosca blanca” sanos e infectados con *I. fumosorosea* en plantaciones de tomate bajo cubierta.

Fecha de muestreo	Temperatura (° C)*	Humedad (%)*	Control			S.C.P.M (1x 10 ⁷ conidios/ml)			S.C.P.M (1x 10 ⁸ conidios/ml)		
			sanos	infectados	TOTAL	sanos	infectados	TOTAL	sanos	infectados	TOTAL
14/05/2009	9,6	77	878	0	878	1432	0	1432	467	0	467
18/05/2009	13	79	2906	0	2906	2292	2	2294	2153	0	2153
20/05/2009	16,3	83	1546	0	1546	3097	10	3107	1970	9	1979
22/05/2009	21,6	75	1782	0	1782	1219	72	1291	1176	107	1283
27/05/2009	7,4	68	3041	0	3041	2363	56	2419	1590	66	1656
29/05/2009	7,2	64	2497	0	2497	2109	35	2144	2081	58	2139

* Los valores de temperatura media del aire (° C) y de la humedad relativa (%) fueron obtenidos a partir del Boletín Agrometeorológico Mensual de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

Tabla 30: Número de individuos de “mosca blanca” sanos e infectados con *I. fumosorosea* en plantaciones de berenjena bajo cubierta.

Fecha de muestreo	Temperatura (° C)*	Humedad (%)*	Control			S.C.P.M (1x 10 ⁷ conidios/ml)			S.C.P.M (1x 10 ⁸ conidios/ml)		
			sanos	infectados	TOTAL	sanos	infectados	TOTAL	sanos	infectados	TOTAL
14/05/2009	9,6	77	335	0	335	279	0	279	135	0	135
18/05/2009	13	79	237	0	237	269	2	271	300	0	300
20/05/2009	16,3	83	379	0	379	332	7	339	496	5	501
22/05/2009	21,6	75	661	0	661	894	47	941	397	34	431
27/05/2009	7,4	68	785	0	785	1859	238	2097	1176	107	1283
29/05/2009	7,2	64	503	0	503	462	12	474	1285	46	1331

* Los valores de temperatura media del aire (° C) y de la humedad relativa (%) fueron obtenidos a partir del Boletín Agrometeorológico Mensual de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

En plantaciones de berenjena (variedad Barcelona) las poblaciones de “mosca blanca” fueron aumentando a media que transcurría el tiempo (figura 46 B), alcanzando un valor promedio de 627 individuos en 10 plantas. El número promedio de individuos de “mosca blanca” registrado en la parcela control, S.C.P.M (1×10^7 conidios/ml) y S.C.P.M (1×10^8 conidios/ml) fue de 483 individuos, 734 individuos y 664 individuos, respectivamente.

La aplicación de S.C.P.M de *I. fumosorosea* en las plantaciones de berenjena originó la infección de individuos de “mosca blanca” a partir del cuarto día (18/05/2009) y continuó hasta los 15 días posteriores a la aplicación (29/05/2009) (tabla 30). En la parcela donde se pulverizó S.C.P.M (1×10^7 conidios/ml) se registró un total de 306 individuos infectados y en la parcela con S.C.P.M (1×10^8 conidios/ml) se cuantificó un total de 192 infectados. La infección de los adultos se observó al comienzo del ensayo (18/05/2009), alcanzando el valor máximo a los 8 días posteriores a la inoculación (22/05/2009). Sin embargo, la infección de las ninfas se observó al octavo día (22/05/2009) y continuó por un total de 15 días posteriores (29/05/2009) (figura 47 B).

En las plantaciones de berenjena, la aplicación de S.C.P.M (1×10^7 conidios/ml) ocasionó un 6,6 % de adultos infectados al octavo día post-aplicación y un 12,2 % de ninfas infectadas a los 13 días (figura 47 B). En la parcela donde se pulverizó la S.C.P.M (1×10^8 conidios/ml) se observó el mayor porcentaje de infección de los adultos (3,6 %) a los 13 días, y de las ninfas (12,7 %) a los 8 días posteriores a la aplicación (figura 47 B). Por lo tanto, se puede destacar que ambas concentraciones de S.C.P.M presentaron un porcentaje de infección similar, con un máximo de mortalidad a los 8 y 13 días subsiguientes a la inoculación de *I. fumosorosea*.

Al comparar el efecto de S.C.P.M sobre las poblaciones de “mosca blanca” presentes en los cultivos hortícolas, se observó que el porcentaje de individuos infectados fue mayor en las plantaciones de berenjena en comparación con las plantaciones de tomate (figura 47). Además, se observó que la infección de ninfas y adultos ocurrió en igual intensidad en los cultivos de tomate, sin embargo, en los cultivos de berenjena se observó una mayor infección de ninfas que de adultos. Estas diferencias observadas entre los cultivos hortícolas podrían deberse a las fluctuaciones de la población de “mosca blanca”, como así también, a un posible efecto de la planta hospedera.

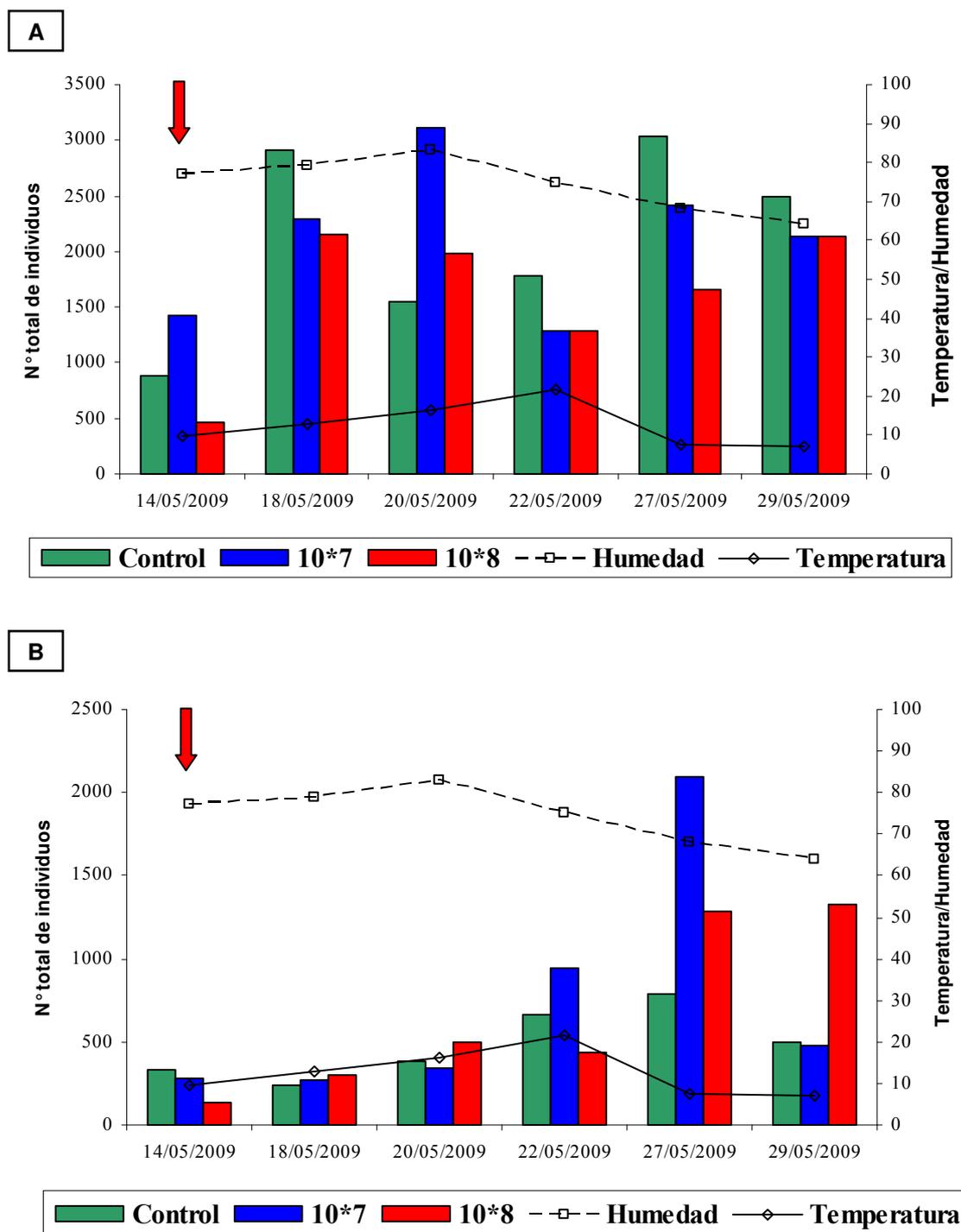


Figura 46: Número total de individuos de “mosca blanca” en las plantaciones de tomate (A) y berenjena (B) ubicadas bajo cubierta.

Las plantaciones de hortalizas fueron divididas en 3 parcelas (con 10 plantas por parcela), en las cuales se pulverizó Tween 80 (0,01%) (Control) o dos concentraciones de S.C.P.M de *I. fumosorosea* (1×10^7 o 1×10^8 conidios/ml). Durante un mes se cuantificó el número total de individuos de “mosca blanca” en cada parcela. **A:** Plantaciones de tomate variedad Elphida. **B:** Plantaciones de berenjena variedad Barcelona. **10*7:** concentración de 1×10^7 conidios/ml de la S.C.P.M. **10*8:** concentración de 1×10^8 conidios/ml de la S.C.P.M. La flecha roja indica el momento de la aplicación (14/05/09).

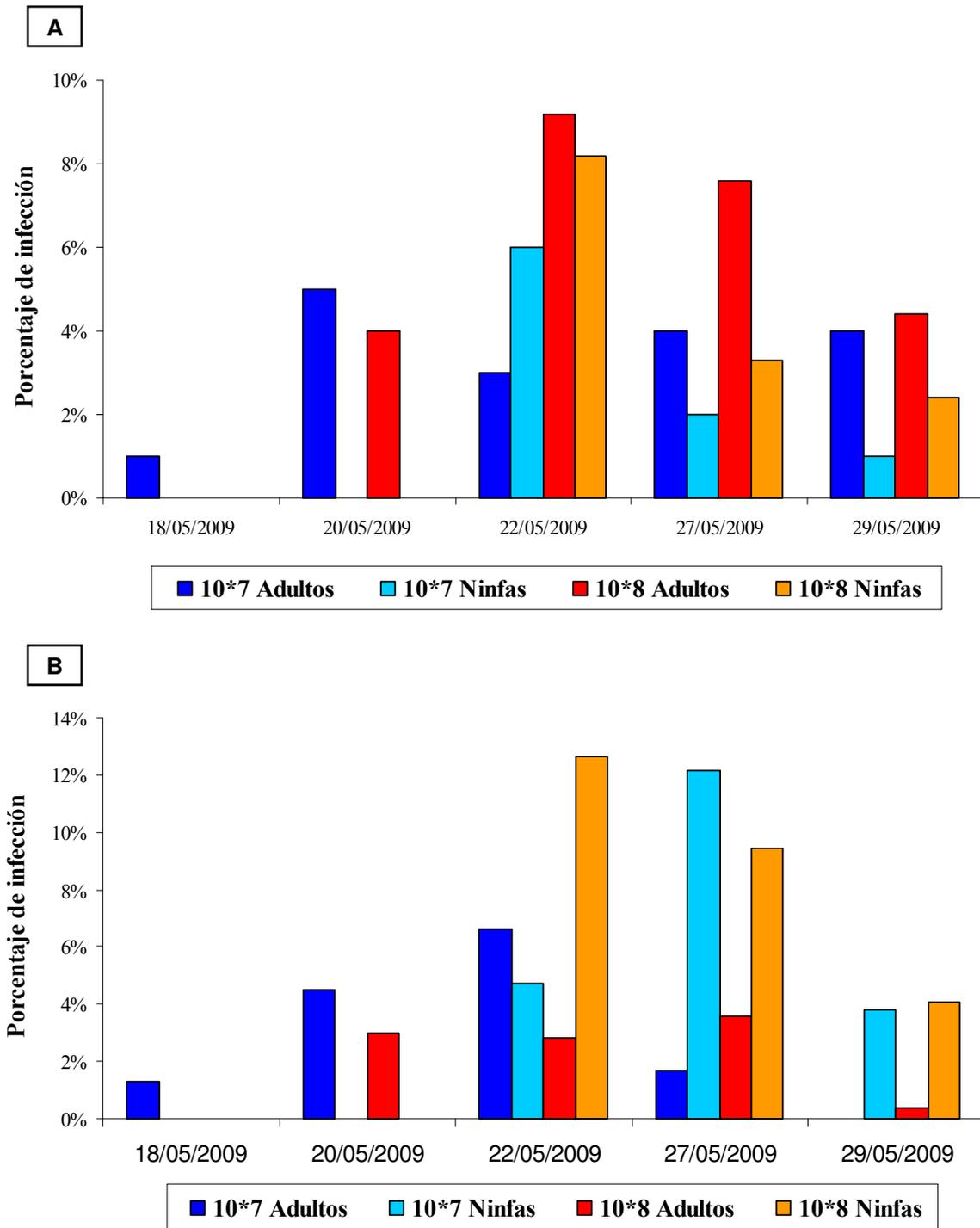


Figura 47: Porcentaje de individuos infectados de “mosca blanca” en plantaciones de tomate y berenjena bajo cubierta.

El día 14/05/09 se pulverizó dos concentraciones de S.C.P.M de *I. fumosorosea* (1×10^7 o 1×10^8 conidios/ml) en plantaciones de tomate y berenjena. En los días subsiguientes, se cuantificó el número total de adultos y ninfas infectadas en cada parcela y se estimó el porcentaje de individuos con infección de *I. fumosorosea*. **A:** Plantaciones de tomate variedad Elphida. **B:** Plantaciones de berenjena variedad Barcelona. **10*7:** concentración de 1×10^7 conidios/ml de la S.C.P.M. **10*8:** concentración de 1×10^8 conidios/ml de la S.C.P.M.

El porcentaje de infección máximo obtenido durante el ensayo de patogenicidad a campo fue del 12,7 % para ninfas y de 9,2 % para adultos de “mosca blanca”. Estos valores se asemejan a la mortalidad obtenida en los ensayos realizados bajo condiciones de laboratorio, en los cuales se alcanzó un valor promedio de 17,2 % para ninfas y 12,5 % para adultos.

Cabe destacar que durante la realización del ensayo de patogenicidad no se observó la infección de ningún otro insecto plaga (“trips” o “pulgonos”) hallado en las plantaciones hortícolas.

3.5.5. Persistencia de los conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) en el suelo

Se evaluó la persistencia de los conidios del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* en el suelo, mediante la aplicación de una alícuota de la S.C.P.M sobre un espacio reducido de suelo dentro de los invernáculos de la Estación Experimental Julio Hirschhorn, Los Hornos. Al cabo de 4, 15, 30, 40 y 60 días, como así también, 9 meses después de la inoculación se extrajo una muestra de suelo de cada uno de los invernáculos. Todas las muestras fueron diluidas en agua destilada estéril e inoculadas en un medio selectivo con Dodine (Anexo) para observar el desarrollo de colonias de *I. fumosorosea*.

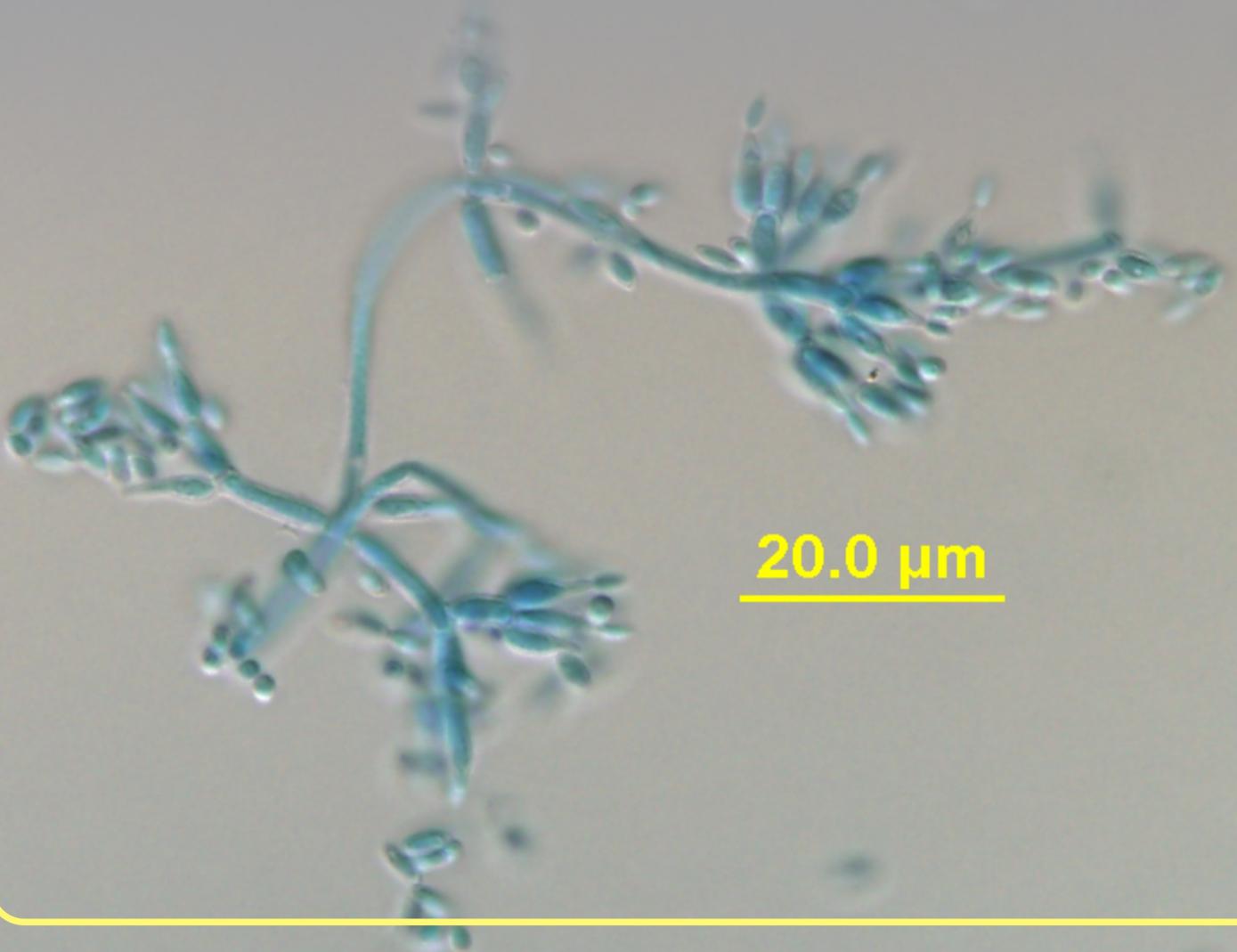
En todas las muestras analizadas se detectó la presencia de colonias de *I. fumosorosea* (CEP 315) en el medio selectivo (tabla 31), indicando que los conidios podrían permanecer viables en el suelo inclusive luego de 9 meses de la inoculación.

Tabla 31: Determinación de la presencia de *I. fumosorosea* en muestras de suelo

Días posteriores a la aplicación	Muestra de suelo*	
	Tomate	Berenjena
4 días	si	si
15 días	si	si
30 días	si	si
40 días	si	si
60 días	si	si
9 meses	si	si

* Las muestras de suelo provenientes del área de estudio fueron diluidas en agua destilada estéril e inoculadas en medio selectivo con Dodine. Cuando se observó el crecimiento de colonias de *I. fumosorosea* en el medio selectivo se indicó con la palabra “si”.

4. DISCUSIÓN



DISCUSION

El relevamiento de “mosca blanca” en cultivos hortícolas de la República Argentina, destacó la presencia de *T. vaporariorum* y *B. tabaci* como una de las principales plagas de cultivos hortícolas bajo cubierta. *T. vaporariorum* fue la especie predominante en los muestreos, registrándose principalmente en plantaciones de tomate, lechuga, chaucha y zapallitos, apio, pepino y zapallo de la provincia de Buenos Aires, mientras que *B. tabaci* se asoció a plantaciones de morón y berenjena de la provincia de Misiones y Buenos Aires. Estos registros coinciden con los estudios realizados por Viscarret *et al.* (2000), en donde se relevó la presencia de *T. vaporariorum* principalmente en cultivos de tomate bajo cubierta ubicados en el Cinturón Hortícola Plantense, como así también, con los estudios realizados por Strassera (2006) donde describió la presencia y peligrosidad de *B. tabaci* en cultivos de morón.

La distribución espacial de los adultos y ninfas de “mosca blanca” en plantaciones de tomate bajo cubierta fue mayor en los laterales del invernáculo, lo cual corresponde a los sitios de entrada de estos insectos y a los lugares más ventilados. A su vez, se observó una estratificación vertical de los estados de desarrollo, observando los adultos mayoritariamente en el estrato superior y los estadios inmaduros en los estratos medios. Esta estratificación resulta del efecto combinado de la oviposición de los adultos en las hojas superiores, la inmovilidad de los estados inmaduros y el crecimiento de la planta (Noldus *et al.*, 1986). Estudios realizados por Basso *et al.* (2001), como así también, por Leite *et al.* (2004) demostraron que *T. vaporariorum* y *B. tabaci* presentan una distribución espacial aglomerada (de contagio) en el área del invernáculo y una distribución estratificada en la planta, estando los adultos localizados en el tercio superior y las ninfas III y IV (“pupas”) en el tercio medio.

La densidad de ninfas y adultos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas bajo cubierta presentó fluctuaciones en las quintas donde se aplicaron productos fitosanitarios, como insecticidas, herbicidas y fungicidas, sin embargo, estas fluctuaciones fueron observadas en menor medida en los cultivos con manejo orgánico en donde el uso de productos fitosanitarios es reducido y se observó la presencia de abundantes parasitoides y depredadores. Existen numerosos trabajos que demuestran el efecto de las labores culturales, el control químico, la fenología de la planta, la presencia de enemigos naturales y las condiciones ambientales, sobre las poblaciones de “mosca blanca” (Horowitz, 1986; Van Lenteren y Woets, 1988; Leite *et al.*, 2004;

Bernal *et al.*, 2008). La densidad de ninfas y adultos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas bajo invernadero fue aumentando a medida que se acercaban los meses de verano (enero-febrero de 2008 y diciembre de 2008), lo cual podría estar relacionado con el aumento en la temperatura ambiental, como lo demostró Leite y colaboradores (2004) al observar una correlación positiva entre la temperatura media y la densidad de adultos de *B. tabaci* en plantaciones de tomate.

La prospección de hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas demostró la presencia de adultos de *T. vaporariorum* infectados con *I. fumosorosea*, como así también, la observación de una epizootia natural de dicho hongo en plantaciones de chaucha bajo cubierta en los meses de mayo y junio del 2007. Estos resultados refuerzan la evidencia bibliográfica donde se destaca a *I. fumosorosea* como uno de los principales hongos patógenos de *T. vaporariorum*, *B. tabaci* y *B. argentifolli* en plantaciones bajo cubierta (invernáculo) o a cielo abierto (campo) (Vidal *et al.*, 1998; Lacey *et al.*, 1999, 2007; Farias y Wraight, 2000; Rodríguez Dos Santos y Del Pozo Núñez (2003), Toledo *et al.*, 2004, Scorsetti *et al.*, 2008). Durante ciertas estaciones con elevada humedad se observaron epizootias causadas por *I. fumosorosea* en poblaciones de *B. tabaci* localizadas en India, Pakistan, Nepal y Estados Unidos (Lacey *et al.*, 1993, 1996, Carruthers *et al.*, 1993; Castineiras, 1995), sin embargo, no existen referencias bibliográficas de la ocurrencia de epizootias de *I. fumosorosea* en Argentina. El desarrollo de infecciones fúngicas sobre adultos de *T. vaporariorum* se observó sólo en la provincia de Buenos Aires durante los meses de mayo, junio y octubre del 2007. Los trabajos realizados por Toledo *et al.* (2004) y Scorsetti *et al.* (2008) en cultivos hortícolas de la provincia de Buenos Aires, registraron infecciones con *I. fumosorosea*, *L. lecanii*, *L. longisporum* y *L. muscarium* en individuos de *T. vaporariorum* durante los meses de mayo-junio del 2001, febrero-abril-mayo del 2002, marzo-abril-junio-julio del 2003, abril del 2004 y junio del 2005. Así mismo, durante el mes de junio del 2005 se recolectaron individuos de *B. tabaci* infectados con *I. fumosorosea* en plantas de morón de la provincia de Corrientes (Scorsetti, 2007). Estos resultados permitirían inferir que la estación otoñal es la época más favorece para la ocurrencia natural de los hongos patógenos de “mosca blanca” en la República Argentina.

Por otra parte, los hongos entomopatógenos pueden habitar en el suelo y generar la infección de varios insectos. Los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* fueron detectados en el suelo de una variedad de hábitats y pueden ser aislados directamente mediante la utilización de medios de cultivos selectivos (Doberski y Tribe, 1980) o

indirectamente con la incorporación de insectos trampas (larvas de *Galeria melonella* o *Tenebrio* spp) a las partículas de suelo (Bidochka *et al.*, 1998). En este trabajo de investigación se logró aislar e identificar dos aislamientos de *I. fumosorosea*, dos aislamientos de *B. bassiana* y uno de *L. lecanii* a partir de muestras de suelo de cultivos hortícolas orgánicos y convencionales de la provincia de Buenos Aires. Estudios realizados por Klingen *et al.* (2002) indicaron que el suelo proveniente de la producción agrícola orgánica presentó mayor cantidad de hongos entomopatógenos que los suelos de producción convencional. Sin embargo, en los presentes relevamientos se obtuvieron 3 de los 5 aislamientos a partir de muestras de suelo que provenían de plantaciones de chaucha, acelga y tomate con producción convencional, y solo 2 aislamientos provenían de plantaciones de berenjena con producción orgánica, por lo tanto, se podría indicar que la ocurrencia natural de los hongos entomopatógenos en el suelo dependió de otros factores como puede ser la temperatura, la humedad, el pH, la textura del suelo y la interacción con microorganismos del suelo (Kennedy y Gewin, 1997).

Las características morfológica de los 15 aislamientos fúngicos de *I. fumosorosea* (CEP 302 a CEP 316), coincidieron con la descripción realizada por Samson (1974) sobre el aspecto y diámetro de la colonia, sin embargo el tamaño de los conidios y las fialides fueron levemente mayores a las presentadas por dicho autor. Las temperaturas óptimas del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* fueron 20° y 25° C, ya que se obtuvo el máximo crecimiento y porcentaje de germinación, sin embargo, a 16° y 33° C estos parámetros fueron afectados negativamente. Similares resultados fueron obtenidos por Vidal *et al.* (1997), los cuales demostraron que el rango de temperatura óptimo para el crecimiento de *I. fumosorosea* fue de 20° a 30° C, y que las temperaturas superiores a los 30° C e inferiores a los 11° C limitaron notablemente el crecimiento de *I. fumosorosea*. Asimismo, Hall *et al.* (1994) indicaron que la temperatura óptima para el crecimiento de *I. fumosorosea* es de 28° C, mientras que para la esporulación es de 24° C. Contrariamente, los trabajos de Cabanillas y Jones (2009) demostraron que ciertos aislamientos de *Isaria* sp. obtenidos a partir de *B. tabaci* en Texas presentaron un tasa de crecimiento superior al ser incubados a 30° C en comparación con la incubación a 25° C, además, observaron una tolerancia a temperaturas superiores a los 35° C, sugiriendo que estos aislamientos serian efectivos para el control de “mosca blanca” en regiones subtropicales y semiáridas.

Las técnicas de biología molecular son utilizadas en la actualidad para identificar y caracterizar la variabilidad genética de los hongos entomopatógenos. Tigano-Milani *et*

al. (1995b), Cantone y Vandenberg (1998), Azevedo *et al.* (2000) y Fargues *et al.* (2002), utilizaron la técnica de PCR (RAPD-PCR, RFLP-PCR o amplificación y secuenciación de genes nucleares) para analizar varios aislamientos de *I. fumosorosea*. Estos autores sugirieron que las variaciones entre los aislamientos estarían relacionadas con el origen geográfico y el insecto hospedador. En este trabajo de investigación se analizaron 33 aislamientos fúngicos correspondientes a 5 especies de *Isaria* (*I. fumosorosea*, *I. farinosa*, *I. tenuipes*, *I. javanica* e *I. amoenorosea*) que provenían de Brasil y Argentina. La caracterización consistió en la amplificación de dos genes nucleares (el factor de elongación 1- α y los espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal) y la subsiguiente digestión con enzimas de restricción (RFLP-PCR). El factor de elongación 1- α (EF1- α) fue amplificado con el par de primer 983F y 2218R y se obtuvo un fragmento de 1100 pb, lo cual coincide con el trabajo realizado por Rehner y Buckley (2005) al amplificar dicho gen en *B. bassiana*. Los espaciadores transcritos internos junto con el gen del ADN ribosomal 5,8S (ITS1-5,8S-ITS2) fueron amplificados con los primers TW81F y AB28R obteniendo un fragmento de 600 pb. Inglis y Tigano (2006) llevaron a cabo la amplificación de dicho gen obteniendo un fragmento de 500 pb, siendo este resultado diferente al obtenido en el presente estudio. La enzima de restricción *Hae* III originó un polimorfismo interespecífico que permitió identificar como *I. fumosorosea* a 18 aislamientos fúngicos provenientes de Argentina (CEP 302 a CEP 316) y Brasil (CNPSO-104, CNPSO-105 y CNPSO-106), como así también, identificar como *I. farinosa* a un aislamiento de Argentina. Resultados similares fueron obtenidos por Azevedo *et al.* (2000) al utilizar la enzima *Hae* III para detectar variabilidad entre las secuencias de nucleótidos del gen ITS de las especies *I. fumosorosea* e *I. tenuipes*. Sin embargo, hasta el momento no existen referencias bibliográficas sobre la variabilidad del gen EF1- α dentro del género *Isaria*, siendo estos resultados novedosos en el ámbito científico.

Las pruebas de patogenicidad llevadas a cabo con los 15 aislamientos de *I. fumosorosea* en condiciones de laboratorio, demostraron que éstos son altamente virulentos para ninfas IV de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*, alcanzando valores de mortalidad superiores al 80 % y 70 %, respectivamente. Estos resultados refuerzan los estudios realizados por Vidal *et al.* (1997), Negasi *et al.* (1998), Wraight *et al.*, 1998, Herrera *et al.* (1999), Rodríguez Dos Santos y Del Pozo Núñez (2003), Osborne y Landa (2004) y Scorsetti *et al.* (2008), sobre la actividad de *I. fumosorosea* en ninfas de “mosca blanca” bajo condiciones de laboratorio. Gokce y Er (2005) estudiaron el

proceso de infección de *I. fumosorosea* sobre ninfas del segundo estadio de *T. vaporariorum* en un microscopio electrónico de barrido. A las 24 horas posteriores a la inoculación del hongo, se observó la germinación de los conidios adheridos a la cutícula. A las 36 horas, se determinó la formación del tubo germinativo y del apresorio, la cual ocurrió de dos maneras diferentes: en las áreas intersegmentales del abdomen se observó la formación de un tubo germinativo corto y un apresorio en el ápice de éste, mientras que en la cabeza y el tórax, se desarrolló un tubo germinativo largo con un apresorio en la región terminal. Estas diferencias se deberían a la flexibilidad de la cutícula sobre las regiones intersegmentales del abdomen en comparación con la rigidez de la cabeza y el tórax. A las 48 horas posteriores a la inoculación, se observó la propagación del hongo dentro del hemocele mediante la formación de blastosporas y el subsiguiente desarrollo de hifas. En ese momento, la coloración externa de la ninfa cambió hacia un color blanco amarillento y de aspecto opaco, debido a la colonización completa de las partes internas del insecto por parte de las hifas del hongo. Finalmente, se observó la emersión de estructuras fúngicas hacia el exterior del cuerpo del insecto y el desarrollo de un micelio blanco rosáceo de aspecto algodonoso que cubrió completamente la ninfa. Estos resultados fueron la primera evidencia sobre la formación de un apresorio por parte de *I. fumosorosea* al infectar ninfas de *T. vaporariorum*. En las pruebas de patogenicidad realizadas en este trabajo de investigación, se observó el desarrollo de micelio externo blanco con aspecto algodonoso que cubrió completamente el cuerpo de las ninfas de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*, luego de tres días posteriores a la muerte, siendo este resultado consistente con los estudios de Landa *et al.* (1994), Wraight *et al.* (1998), Gokce y Er (2005).

El aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* fue seleccionado por presentar un crecimiento moderadamente rápido y elevado porcentaje de germinación de los conidios, como así también, por ser altamente virulento contra ninfas de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*. Este aislamiento fue utilizado para evaluar la susceptibilidad de los estados de desarrollo de *T. vaporariorum*, observando la infección de todos los estadios ninfales y adultos, mientras que los huevos no presentaron ningún síntoma de infección. Los estadios más susceptibles a *I. fumosorosea* fueron las ninfas II y III, y los adultos con porcentajes de mortalidad de 49,76 %, 50,27 % y 59,76 %, respectivamente. En general, los huevos de “mosca blanca” son resistentes a la infección por hongos entomopatógenos, debido a que las estructuras fúngicas no pueden penetrar el corion (Fuxa, 1987; Fransen *et al.*, 1987). Sin embargo, en algunas excepciones fueron

observadas al exponer huevos de *B. argentifolli* y *B. tabaci* con blastosporas o a suspensiones de conidios de *I. fumosorosea*, respectivamente (Osborne et al., 1990; Lacey et al., 1999). Fransen et al. (1987), Lacey et al. (1999) y Gindin et al. (2000) demostraron que aunque los huevos no fueron infectados con *Aschersonia aleyrodis*, *I. fumosorosea* o *Lecanicillium lecanii*, pero las ninfas I recién eclosionadas presentaron elevados porcentajes de mortalidad. Las ninfas II y III son más susceptibles a la infección por *I. fumosorosea* en comparación con el cuarto estadio ninfal (o “pupa”) (Vidal et al., 1997; Wraight et al., 1998), lo cual puede deberse a la estructura de la cutícula y a los cambios fisiológicos llevados a cabo por el insecto antes del proceso de muda (Fuxa 1987, Fransen et al., 1987). Contrariamente, Osborne et al. (1990) y Landa et al. (1994) indicaron que el cuarto estadio ninfal era el más susceptible a la infección por *I. fumosorosea* (Pfr 97). Sin embargo, esta gran diferencia se debe al método de bioensayo utilizado por éstos autores, en donde las ninfas eran removidas de la planta hospedera e inoculadas sobre un portaobjeto estéril con una gota de la suspensión de conidios, mientras que el bioensayo empleado por Vidal et al. (1997) y Wraight et al. (1998) consistió en la pulverización de las hojas con ninfas IV. En este trabajo de investigación, los adultos de *T. vaporariorum* fueron los más susceptibles a la infección por *I. fumosorosea*, caso contrario a lo observado por Fransen et al. (1987) donde los adultos tratados con *A. aleyrodis* fueron menos susceptibles que los estadios ninfales.

Asimismo, se realizó un ensayo preliminar para evaluar el efecto del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* sobre uno de los parasitoides de la “mosca blanca”, *Eretmocerus* sp. Haldeman (Hymenoptera: Aphelinidae), observando que éste aislamiento causó un 20 % de infección en las ninfas de *T. vaporariorum* parasitadas y un 70 % en las ninfas no parasitadas. Estos resultados indicarían que *I. fumosorosea* tendría un efecto reducido sobre las ninfas parasitadas con *Eretmocerus* sp. y, por lo tanto, podrían ser utilizados conjuntamente. Osborne y Landa (1992) reportaron que *I. fumosorosea* fue compatible con el parasitoide *Eretmocerus* sp. y el depredador *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae). Sin embargo, se debería continuar con los estudios sobre la compatibilidad de *I. fumosorosea* (CEP 315) con los enemigos naturales de la “mosca blanca” (parasitoides y depredadores) según los trabajos realizados por Brooks (1993), Lacey et al. (1996, 1997) y Poprawski et al. (1998).

La interacción de los hongos entomopatógenos con los productos fitosanitarios utilizados en la producción agrícola, es un área de investigación de gran interés para la aplicación conjunta de éstos en el manejo integrado de plagas. Así mismo, en los

últimos años el uso del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* para controlar los microorganismos fitopatógenos aumentó en América Latina, por lo que es necesario estudiar la interacción de *T. harzianum* con los hongos entomopatógenos. Por lo tanto, se evaluó el efecto de 7 formulaciones químicas y una formulación a base de *T. harzianum* sobre la germinación, el crecimiento radial y la patogenicidad de dos aislamientos de *I. fumosorosea* (CEP 304 y CEP 315). Ninguno de los fungicidas evaluados ocasionaron efectos fungistáticos ni cambios en la morfología de la colonia en cultivos *in vitro*, sin embargo, los fungicidas Azoxistrobina 0,04 % (nombre comercial AMISTAR), Carbendazim 0,15 % (CARBENDAZIM ACTIVO), Triadimefon 0,05 % (BAYLETON) y Procimidona 0,10 % (SUMILEX), redujeron significativamente el porcentaje de germinación de los conidios y la tasa de crecimiento de ambos aislamientos de *I. fumosorosea*. Los fungicidas Oxiclورو de Cobre 0,15 % (OXICLORURO DE COBRE CIP) y Fenarimol 0,05 % (RUBIGAN) afectaron negativamente la patogenicidad de los conidios de CEP 314 y CEP 315 al aplicarse conjuntamente. Por lo tanto, los únicos fungicidas que no afectaron a los dos aislamientos de *I. fumosorosea* fueron Propamocarb 0,15 % (PREVICUR) y *T. harzianum* 0,05 % (TRICHO-D). Estos resultados refuerzan los trabajos realizados por Sapięha-Wasiewicz *et al.* (2004) donde se demostró que Fenarimol (nombre comercial Rubigan 12 EC) presentó un efecto negativo sobre el crecimiento y la esporulación de *I. fumosorosea*, sin embargo, éste efecto fue revertido cuando los aislamientos fúngicos eran traspasados a medios de cultivo sin fungicidas. Perry y Latgé (1983) demostraron que Carbendazim (BAVISTINE) inhibe completamente la germinación de las esporas de resistencia de *Conidiobolus obscurus*. Asimismo, Bruck (2009) indicó que Azoxistrobina (nombre comercial HERITAGE WG) inhibe la germinación de los conidios y el crecimiento vegetativo de *M. anisopliae* en cultivos *in vitro*, mientras que Propamocarb (BANOL WP) no presentó ningún impacto sobre dicho parámetros fisiológicos. Sosa-Gómez *et al.* (2003) indicó que Carbendazim (DEROSAL) generó una pequeña reducción en la germinación de tres aislamientos de *Nomuraea rileyi* (Nr250, Nr304 y Nr424) en condiciones de laboratorio. Estudios realizados por Moino y Alves (1999) demostraron que el hongo *Trichoderma* sp. inhibió el crecimiento vegetativo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* cuando fueron inoculados simultáneamente o al cabo de 48 horas posteriores a la aplicación de los dos hongos entomopatógenos en cultivos *in vitro*. Otro parámetro estudiado fue el efecto de los fungicidas sobre la patogenicidad y virulencia de los hongos entomopatógenos. Storey y

Garder (1986) reportaron que el fungicida Mefluidide no presentó efectos deletéreos sobre la infectividad y mortalidad de *B. bassiana* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* en condiciones de laboratorio. Stansly y Orellana (1990) y Sosa-Gómez *et al.* (2003) demostraron que la aplicación del fungicida Benomyl y Difenconazole inhibió el desarrollo de *N. rileyi* causando un incremento en las poblaciones de *Anticarsia gemmatalis* y *Trichoplusia ni* presentes en plantaciones de soja. Por otra parte, existen muy pocas investigaciones llevadas a cabo para evaluar el efecto de los fungicidas sobre poblaciones de insectos plagas. Michaud y Grant, (2003) demostraron que las formulaciones a base de sulfato de cobre ocasionaban efectos sub-letales en el desarrollo y reproducción de tres especies de Coleópteros. Van de Viere *et al.* (2004) reportó que los fungicidas Maneb y Mancozeb tuvieron un efecto negativo sobre los huevos y ninfas de *T. vaporariorum*. En este trabajo de investigación se observó que la aplicación de oxiclورو de cobre provocó un cambio en la coloración de las ninfas de *T. vaporariorum* a un color verdoso y luego a un color castaño, indicando que éste fungicida penetró la cutícula del insecto y generó su muerte. Hasta el momento no existen referencias bibliográficas sobre el efecto de los fungicidas sobre las poblaciones de “mosca blanca”, por lo que se sugiere continuar con estos estudios.

Una vez evaluada la patogenicidad del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* y la compatibilidad con productos fitosanitarios en condiciones de laboratorio, se decidió llevar a cabo la producción artesanal de este aislamiento fúngico y evaluar su patogenicidad sobre poblaciones de “mosca blanca” en cultivos hortícolas bajo cubierta.

Según los ensayos realizados en el presente estudio se determinó que el sustrato más adecuado para la multiplicación del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* fue el arroz, obteniendo un rendimiento de $1,04 \times 10^9$ conidios/gramo de arroz al incubar este sustrato en una estufa de cultivo a 25°C en condiciones de oscuridad durante 25 días. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Espinel *et al.* (2008) donde se indicó que los granos de arroz, avena, maíz y soja permitieron la multiplicación y esporulación de los aislamientos de *Isaria* sp., sin embargo, los granos de arroz fueron seleccionados debido a que presentaron el mayor rendimiento ($1,19 \times 10^9$ conidios por gramo de arroz) y un costo de producción inferior. Asimismo, Arredondo-Bernal y Hernández-Velazquez (2000) demostraron que la producción de conidios de *I. fumosorosea* en granos de arroz varió entre $2,5 \times 10^{11}$ conidios a 5×10^{11} conidios por bolsa de polipropileno conteniendo 250gr de arroz. Luego de la multiplicación en granos de arroz, se separó la biomasa fúngica por vía húmeda, obteniendo finalmente

una suspensión de conidios del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* (S.C.P.M). Esta suspensión de conidios fue analizada en condiciones de laboratorio, observando un 98,68 % de germinación de los conidios y la infección de todos los estadios ninfales y adultos de *T. vaporariorum*. Sin embargo, los valores de mortalidad de la S.C.P.M fueron significativamente menor que los valores obtenidos con la suspensión de conidios de CEP 315 proveniente de medio agarizado (S.C.M.A), indicando que la multiplicación en granos de arroz afectó la patogenicidad de los conidios de *I. fumosorosea*. Esto podría deberse a que el arroz presenta un contenido nutricional más pobre que el medio de cultivo SDYA y que la falta de nutrientes podría afectar a ciertos factores determinantes del mecanismo de acción del aislamiento CEP 315, como por ejemplo, la capacidad de adherencia de los conidios a la cutícula del insecto, la producción de enzimas quitinasas o la producción de toxinas.

La aplicación de la S.C.P.M de *I. fumosorosea* en plantaciones de tomate y berenjena ubicadas bajo cubierta en Los Hornos, partido de La Plata, Buenos Aires, ocasionó la infección de todos los estadios inmaduros y adultos de “mosca blanca” presentes en ambos cultivos hortícolas. La presencia de individuos infectados comenzó a observarse a partir del cuarto día y continuó hasta los 15 días posteriores a la aplicación, obteniendo el número máximo de individuos infectados en el octavo día. En las plantaciones de berenjena se registró un 3,6 % de infección en adultos y un 12,7 % en ninfas, mientras que en las plantaciones de tomate se determinó un 9,2 % para los adultos y 8,2 % para las ninfas. Estas diferencias podrían deberse a la influencia que ejerce la planta hospedera sobre el desarrollo de las poblaciones de “mosca blanca”, como así también, al microclima que se genera dentro de cada invernáculo y a la estrategia de manejo utilizada. Poprawski y Jones (2000) registraron que las ninfas de *B. argentifolli* criadas en plantas de melón fueron altamente susceptibles a la infección por *B. bassiana* e *I. fumosorosea* en comparación con las ninfas criadas en algodón en condiciones de laboratorio. Además, indicaron que las plantas de algodón producen algún compuesto inhibidor del crecimiento de los hongos entomopatógenos y que, por lo tanto, le confiere protección a las ninfas de *B. argentifolli*. Santiago-Álvarez *et al.* (2006) citaron diferencias en la mortalidad de *B. bassiana* sobre *B. tabaci* y *T. vaporariorum* cuando éstos insectos fueron criados sobre tabaco, pepino, tomate, poroto, repollo, melón, morón y algodón. Contrariamente, Vidal *et al.* (1998) reportó que la interacción entre las ninfas de *B. argentifolli* e *I. fumosorosea* no fue afectada por

la planta hospedadora, en términos de la mortalidad de las ninfas, la esporulación en los cadáveres y la viabilidad de los conidios.

En el caso del manejo integrado de las poblaciones de “mosca blanca” es muy importante estudiar la influencia de las condiciones climáticas, ya que juegan un rol fundamental en el desarrollo de los hongos entomopatógenos (Farias y Wraight, 2001; Fargues *et al.*, 2003; Vidal y Fargues, 2007). Dentro de los invernáculos, las condiciones ambientales son más estables y por lo tanto, la eficiencia de los hongos entomopatógenos en estos lugares son notablemente mayores que las obtenidas a cielo abierto (Farias y Wraight, 2001). Boulard *et al.* (2002) estimó el microclima de la superficie del envés de la hojas de tomate bajo invernadero mediante termografía y observó un aumento en la humedad cuando la tasa de transpiración de la planta es máxima, lo que podría favorecer la acción de los hongos entomopatógenos.

Numerosos estudios demuestran la efectividad del hongo entomopatógeno *I. fumosorosea* sobre las poblaciones de “mosca blanca” en plantaciones bajo cubierta o a campo (Landa *et al.*, 1994; Wraight *et al.*, 1996, 2000; Vidal, 1998; Rodrigues Dos Santos y Del Pozo Nuñez, 2003b; Espinel *et al.* 2008). Vidal *et al.* (1998) reportó que una simple aplicación de *I. fumosorosea* (PFR-97) en plantaciones de tomate y pepino bajo cubierta resultó en un 82 % a 88 % de mortalidad de las ninfas de *B. argentifolii* a los 14 días posteriores a la aplicación, y todas las ninfas con infección fúngica presentaron abundante esporulación siendo una fuente importante de inóculo para una segunda infección (Vidal *et al.*, 1998). Rodríguez Dos Santos y Del Pozo Nuñez (2003) observaron que mediante aplicaciones sucesivas de *I. fumosorosea* en plantaciones de tomate orgánico bajo cubierta, redujeron las poblaciones de los estados inmaduros de *T. vaporariorum*, demostrando que este hongo entomopatógeno tiene un gran potencial para ser utilizado en control biológico de la mosca blanca en invernáculos ubicados en el Sur de Uruguay. Así mismo, Espinel *et al.* (2008) indicaron que el preformulado a base de *I. fumosorosea* y el bioplaguicida a base de *L. lecanii* pueden ser utilizados dentro del manejo integrado de la “mosca blanca”, ya que obtuvieron elevada eficiencia sobre poblaciones de *B. tabaci*, como así también, una mayor rentabilidad en plantaciones de melón y tomate en Colombia. En Argentina no existen antecedentes previos sobre la utilización de hongos entomopatógenos para controlar las poblaciones de “mosca blanca”, por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son el primer registro sobre la acción de aislamientos nativos de *I. fumosorosea* en cultivos hortícolas de la provincia de Buenos Aires.

La persistencia de los hongos entomopatógenos en el suelo puede ser afectada por las condiciones ambientales (temperatura, humedad y pH del suelo), por la diversidad de microorganismos en el suelo y por las practicas agrícolas (utilización de productos fitosanitarios, rotación de cultivos) (Kennedy y Gewin, 1997). Sin embargo, existen muy pocos estudios que evalúen el efecto de estos parámetros *in situ*. En este trabajo de investigación se demostró que los conidios del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* permanecieron viables en el suelo de cultivos hortícolas hasta 9 meses después de su aplicación, lo cual podría deberse a que las condiciones ambientales en los invernáculos son mas estables y, por lo tanto, favorecerían la persistencia del hongo *I. fumosorosea* en el suelo. Sin embargo, estos resultados son considerados preliminares y se debería continuar con el estudio de la persistencia del aislamiento CEP 315 en el suelo.

5. CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- ❖ Como resultado de la prospección de hongos patógenos de “mosca blanca” en cultivos hortícolas de la Republica Argentina, se recolectaron adultos de *T. vaporariorum* infectados con *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith en Colonia Urquiza, provincia de Buenos Aires. Estas infecciones fueron observadas durante los meses de mayo, junio y octubre del 2007, siendo esta época del año la más propicia para el desarrollo de infecciones fúngicas.
- ❖ Se obtuvieron 20 aislamientos *in vitro* de hongos entomopatógenos del Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales, Familia Cordycipitaceae, de los cuales 15 provienen de adultos de *T. vaporariorum* infectados con *I. fumosorosea* (Wize) Brown & Smith y 5 a partir del suelo de las plantaciones hortícolas, correspondiendo 2 a *I. fumosorosea*, 2 a *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, y uno a *Lecanicillium* sp. Gams & Zare.
- ❖ La amplificación de dos genes nucleares (EF1- α y ITS1-5,8S-ITS2) y la subsiguiente digestión con enzimas de restricción (RFLP-PCR) permitió confirmar la identificación de los 15 aislamientos de *I. fumosorosea* provenientes de adultos de *T. vaporariorum* de Argentina (CEP 302 a CEP 316), como así también, identificar como *I. fumosorosea* a 3 aislamientos obtenidos de *B. tabaci* Biotipo B de Brasil y como *I. farinosa* a un aislamiento proveniente de Hymenopteros de Argentina. Por lo tanto, ambos genes son adecuados para caracterizar la variabilidad genética entre las especies del genero *Isaria*.
- ❖ Todos los aislamientos de *I. fumosorosea* fueron altamente virulentos para ninfas IV de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*, ya que presentaron un porcentaje de mortalidad superior al 80 % y 70 %, respectivamente. El aislamiento CEP 315 fue seleccionado como el más virulento, ya que presentó un 100 % de mortalidad para ambas especies de “mosca blanca”.
- ❖ El aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* ocasionó la infección de todos los estados de desarrollo de *T. vaporariorum*, a excepción de los huevos. Los adultos y las ninfas II y III fueron los estadios más susceptibles, obteniendo porcentajes de

mortalidad de 59,76%, 49,76% y 50,27%, respectivamente. Las ninfas I y IV (“pupa”) presentaron porcentajes de mortalidad inferiores, que alcanzaron un 9,43 % y 5,66 %, respectivamente.

- ❖ El aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* presentó un efecto reducido sobre ninfas de *T. vaporariorum* parasitadas con *Eretmocerus* sp. Haldeman (Hymenoptera: Aphelinidae), observando un 20 % de infección en las ninfas parasitadas y un 70 % de infección en las ninfas no parasitadas. Estos resultados son un primer acercamiento sobre la compatibilidad de CEP 315 con los parasitoides de la “mosca blanca” y, por lo tanto, se debería continuar con estos estudios.
- ❖ Los fungicidas Propamocarb 0,15 % y *Trichoderma harzianum* 0,5 % no presentaron efectos sobre la germinación de los conidios, la tasa de crecimiento diaria y la patogenicidad de los aislamientos CEP 304 y CEP 315 de *I. fumosorosea*, por lo tanto, podrían ser recomendados para una aplicación conjunta dentro de un marco integrado de la “mosca blanca”.
- ❖ El sustrato más adecuado para la multiplicación del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea* fue el arroz, ya que presentó elevados rendimientos de conidios y es económicamente más barato que el trigo y el salvado.
- ❖ Las condiciones óptimas para la producción artesanal de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) consistieron en bolsas de polipropileno conteniendo arroz parbolizado precocido y esterilizado e incubadas en una estufa de cultivo a 25° C en condiciones de oscuridad durante 25 días.
- ❖ La suspensión de conidios de *I. fumosorosea* (CEP 315) obtenida luego de la multiplicación en granos de arroz (S.C.P.M) causó la infección de todos los estados inmaduros y de los adultos de *T. vaporariorum* en condiciones de laboratorio. Sin embargo, la patogenicidad de S.C.P.M fue significativamente menor a la observada con la suspensión de conidios obtenida de medio agarizado (S.C.M.A), indicando que la multiplicación en granos de arroz disminuyó la virulencia del aislamiento CEP 315.

- ❖ La aplicación de la S.C.P.M de *I. fumosorosea* (CEP 315) en plantaciones de tomate y berenjena ubicadas bajo cubierta en Los Hornos, partido de La Plata, Buenos Aires, ocasionó la infección de todos los estadios inmaduros y adultos de “mosca blanca” presentes en ambos cultivos hortícolas. Por lo tanto, *I. fumosorosea* (CEP 315) tendría condiciones potenciales para ser utilizada en el control microbiano de la “mosca blanca” en cultivos hortícolas de la Republica Argentina.

- ❖ Los conidios de CEP 315 permanecieron viables en las partículas del suelo hasta 9 meses después de la inoculación de la suspensión de conidios (S.C.P.M), indicando que el suelo podría ser un lugar de reservorio para los hongos entomopatógenos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS



PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados de esta tesis abren nuevas posibilidades de estudios con miras a ampliar el conocimiento del hongo *Isaria fumosorosea* como potencial agente de control biológico de la “mosca blanca” en cultivos de importancia económica en nuestro país. Los futuros trabajos de investigación podrán ser orientados hacia los siguientes temas:

- La interacción de *I. fumosorosea* con los enemigos naturales (parasitoides y depredadores) de la “mosca blanca”, como así también, con los productos fitosanitarios (insecticidas, herbicidas y fertilizantes) utilizados en la producción agrícola, con el fin de lograr una integración entre los métodos de control en el marco del manejo integrado de plagas.
- La fabricación de un micoinsecticida a base del aislamiento CEP 315 de *I. fumosorosea*, enfatizando en la formulación y en los parámetros ambientales para lograr un control eficaz de las poblaciones de “mosca blanca” en cultivos hortícolas de la Republica Argentina.
- La persistencia de las estructuras reproductivas *I. fumosorosea* en el suelo y en el ambiente, como así también, en su modo de acción para lograr re-infecciones en las poblaciones de “mosca blanca”.

7. BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFIA

- Akey D.H., Henneberry T.J. y Wuertz D.A. 1994. Use of the fungus, *Beauveria bassiana*, as Naturalis-L against the sweetpotato whitefly (SLWF), *Bemisia tabaci* in furrow and sub-drip irrigated cotton. 2nd Ann. Rev. Mtg., Orlando, FL, Jan. 24-27, 1994. En: Supplement to Silverleaf Whitefly 5-Year National Research and Action Plan.
- Alves S.B. 1986. Produção de fungus entomopatogenicos. En: Alves S.B. (Ed.). Controle microbiano de insectos. São Paulo, Manole. pp. 311-323.
- Alves S.B. 1998. Fungos entomopatogenicos. En: Alves S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2nd ed. Fundación de Estudios Agrarios Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brasil. pp. 289-370.
- Alves S.B y López R.B. 2008. Controle microbiano de pragas na America Latina: avanços e desafios. Volumen 14. 1^o ed. FEALQ, Piracicaba, Sao Pablo, Brasil. 414pp.
- Alves S.B y Pereira R.M. 1989. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em bandejas. **Ecossistema**. 14: 188-192.
- Aquino M.L.N., Vital A.F., Cavalcanti V.L.B y Nascimento M.G. 1977. Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em sacos de polipropileno. Boletín técnico da Codecap- Comissão Executiva de Defesa Fitosanitaria de Lavoura Canavieira de Pernambuco. 5, 11p.
- Arredondo-Bernal H.C. y Hernández-Velazquez V.M. 2000. Entomopathogenic fungi in Mexico: regulation, mass production and application. En: Annul Meeting of the Society of Invertebrate Pathology. Abstracts, Mexico, Guanajuato. pp.22.
- Azevedo A.C.S., Furlaneto M.C., Sosa-Gómez D.R. y Fungaro M.H. 2000. Molecular Characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. **Scientia Agricola**. 57(4): 729-732.
- Balcaza L.F. 2006. El cultivo de tomate en el Cinturón Hortícolas de La Plata. **Boletín electrónico de tomate**. 3:2-4.
- Basso C., Franco J., Grille G. y Pascal C. 2001. Distribución espacial de *T. vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) en plantas de tomate. **Bol. San. Veg. Plagas**. 27: 475-487.

- Becerra V.V., Paredes C. Rojo C.M. y France A.L. 2007. RAPD e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*. **Agricultura Técnica (Chile)**. 67 (2): 115-125.
- Bedford I.D., Markham P.G., Brown J.K. y Rosell R.C. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of whitefly (*Bemisia tabaci*) biotypes from different world regions. **Ann. Appl. Biol.** 125: 311-325.
- Bellows T.S., Paine T.D y Gerling D. 1992. Development, Survival, Longevity, and Fecundity of *Clitostethus arcuatus* (Coleoptera: Coccinellidae) on *Siphoninus phillyreae* (Homoptera: Aleyrodidae) in the Laboratory. **Environ. Entomol.** 21: 659-663.
- Bellows T.S., Perring T.M., Gill R.J., y Headrick D.H. 1994. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.** 87: 195–206.
- Benny G.L., Humber R.A. y Morton J.B. 2001. Zygomycota: Zygomycetes. En: McLaughlin, McLaughlin, Lemke (Eds.) The Mycota VII. A Systematic and Evolution. Springer-Verlag, Berlín.
- Berlinger M.J. 1986. Host plant resistance to *Bemisia tabaci*. **Agric. Ecosystems & Environ.** 17:69-82.
- Bernal L., Pesca L., Rodríguez D., Cantor F. y Cure J.R. 2008. Plan de muestreo directo para *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) en cultivos comerciales de tomate. **Agronomía Colombiana**. 26(2): 266-276.
- Berryman A. 1999. The theoretical foundations of biological control. En: Hawkins B.A. y Cornell H.V. (Eds.). Theoretical approaches to biological control. Cambridge University Press, England. pp. 3-21.
- Bidochka M., Kasperski J. y Wild G.A. 1998. Ocurrance of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitat. **Can. J. Bot.** 76:1198-1204.
- Bidochka M. J., McDonald M.A., St. Leger R.J. y Roberts D.W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Curr. Genet.** 25: 107-113.
- 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.

- Blink-Moenen R.M. y Mound L.A. 1990. Whiteflies: diversity, Biosystematics and evolutionary patterns. En: Gerling D. (Ed.), Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management. Intercept Ltd, Wimborne, UK. pp. 1-11.
- Bondar G. 1928. Aleyrodideos do Brasil (2^a. Contribuição). **Bol. Lab. Pathol. Veg.** 5: 1-37.
- Botto, E. 1999. Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. **Rev. Soc. Ento. Arg.** 58(1-2):58-64.
- Boucias D.G., Maccoy C.W. y Joslyn D.J. 1982. Isoenzyme differentiation among 17 geographical isolates of *Hirsutela thompsonii*. **J. Invertebr. Pathol.** 39: 329-337.
- Boucias D.G y Pendland. 1998. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts. USA. 537pp.
- Boucias D.G., Tigano M.S., Sosa-Gómez D.R., Glare T.R. y Inglis P.W. 2000. Genotypic Properties of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi*. **Biol. Control.** 19: 124-138.
- Boulard T., Mermier M., Fargues J., Smits N., Rougier M. y Roy J. 2002. Tomato leaf boundary layer climate: implications for microbiological whitefly control in greenhouses. **Agr.Forest. Meteorol.** 110: 159-176.
- 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.
- Brooks W.M. 1993. Host-parasitoid-patogen interaction. En: Beckage N.E., Thompson S.N. y Federici B.A. (Eds.). Parasites and Pathogens of Insects. Academic Press, San Diego. Vol. 2. pp. 231-272.
- Brown J.K. 1994. A global position paper on the status of *Bemisia tabaci* Genn. as a pest and vector in world agro ecosystems. FAO. **Plant Protection Bull.** 42:3-33.
- Brown J.K., Frolich D.R. y Rossell R.C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies. Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. **Ann. Rev. Entomol.** 40: 511-534.
- Bruck D.J. 2009. Impact of fungicides on *Metarhizium anisopliae* in the rhizosphere, bulk soil an in vitro. **BioControl.** 54: 597-606.

- Burnett T. 1949. The effect of temperature on an insect host-parasite population. **Ecology**. 30 (2): 113-133.
- Byrne D.N. y Bellows T.S. 1991. Whitefly biology. **Ann. Rev. Entomol.** 36: 431-457.
- Byrne D.N., Bellows T.S. y Parrella M.P. 1990. Whiteflies in Agricultural systems. En: Gerling D. (Ed.), Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management. Intercept Ltd, Wimborne, UK. pp. 227-261.
- Cabanillas H.E. y Jones W.A. 2009. Effects of temperature and culture media on vegetative growth of an Entomopathogenic fungus *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitacea) Naturally Affecting the Whitefly, *Bemisia tabaci* in Texas. **Mycopathologia**. 167: 263-271.
- Cáceres S. 2004. Moscas blancas del complejo *Bemisia tabaci* en cultivos hortícolas de corrientes. Estrategias de manejo. Jornada de actualización de Mosca Blanca *Bemisia tabaci*. La Plata, 5 de Junio. pp. 9-13.
- Cáceres S., Aguirre M.R.A. y Miño V.S. 2005 a. El parasitoide *Eretmocerus mundus* Merced controla mosca blanca *Bemisia tabaci* biotipo B en pimiento de Corrientes. XII Congreso Latinoamericano de Horticultura General Roca, Río Negro Argentina, 6-8 /9/05. Libro resúmenes HV33, p. 309.
- Cáceres S., Aguirre M.R.A. y Miño, V.S. 2005 b. Evolución de *Bemisia tabaci* biotipo B en pimiento en invernadero en Bella Vista, Corrientes. XII Congreso Latinoamericano de Horticultura General Roca, Río Negro, Argentina, 6-8 /9/05. Libro resúmenes HV33, p. 310.
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (Casafe). 2007. Guía de productos fitosanitarios para la Republica Argentina. 13° edición. Tomo I.
- Cantone F.A. y Vandenberg J.D. 1998. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycol. Res.** 102, 209-215.
- Cardona C., López-Avila A., Rendón F., Rodríguez I. y Valarezo O. 2005. Sección cuatro: Whiteflies as pests of annual crops in the tropical highlands of Latin America. En: Anderson, P.K.; Morales, F. (Eds.). Whitefly and whitefly-borne viruses in the tropics: Building a knowledge base for global action. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p.269-300.
- Cardona C., Rodrigues I.V., Bueno J.M. y Tapia X. 2005. Biología y Manejo de la mosca blanca, *Trialeurodes vaporariorum*, en habichuela y frijol. Centro

- Internacional de Agricultura Tropical (CIA1); Department for International Development (DFID), Colombia. Publicación CIAT N° 345, pp.1 - 50.
- Carruthers R.I., Wraight S.P. y Jones W.A. 1993. An overview of biological control of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. Proc. Beltwide Cotton Conf. 2: 680-685.
- Castineiras A. 1995. Natural enemies of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in Cuba. **Fla. Entomol.** 78: 538-540.
- Charnley A.K. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. En: Anderson J., Rayner A. y Walton D. Invertebrate-microbial Interactions. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 229-270.
- Charnley A.K. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in Pest Control En: Wicklow y Suderstrom (Eds.) The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationship. Springer, Verlag Berlin Heidelberg. pp.185-201.
- CHFBA (Censo Hortiflorícola de Buenos Aires). 2005. Censo Hortiflorícola Provincia de Buenos Aires MAA y MDE de la Provincia de Buenos Aires.115 pp.
- Clark R.A. 1980. Fungicidal inhibition of *Beauveria bassiana*, a pathogen of the colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* say.) (Coleoptera: Chrysomelidae). **J. New York Entmol. S.** 88 (1): 40.
- Cohen S. 1990. Epidemiology of whitefly-transmitted viruses. En: Gerling D. (Ed.). Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management. Intercept, Hants, United Kingdom. pp. 211-225.
- Costa H.S., Johnson M.W., Ullman D.E., Omer A.D. y Tabashnik B.E. 1993. Sweetpotato Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae): Analysis of Biotypes and Distribution in Hawaii. **Environ. Entomol.** 22: 16-20.
- Coudriet D.L., Prabhaker N., Kishaba A.N. y Meyerdirk D.E. 1985. Variation in development rate on different host and overwintering of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Environ. Entomol.** 14: 516-519.
- Cuthbertson A.G.S, Walters K.F.A y Deppe C. 2005. Compatibility of entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and insecticides for eradication of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. **Mycopathologia.** 160: 35-41.

- De Bach P. y Rosen R. 1991. The natural enemies. En: Biological control by natural enemies. Cambridge University Press, England. pp. 35-87.
- Dittrich V., UK S. y Ernst G.H. 1990. Chemical control and insecticide resistance of whiteflies. En: Gerling, D. (Ed.) Whiteflies: Their bionomics, pest status and management. New Castle, UK, Athenaem Press. p. 263-285.
- Dobersky J.W. y Tribe H.T. 1980. Isolation of entomogenous fungi from elm bark beetle and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 74: 95-100.
- 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.
- Eilenberg J., Hajek A. y Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl.** 46:387-400.
- Espinel C., Torres L., Grijalba E., Villamizar L. y Cotes A.M. 2008. Preformulados para el control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en condiciones de laboratorio. **Revista Colombiana de Entomología.** 34 (1): 22-27.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). www.eppo.org.
- Farias M. y Wraight S.P. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. **Crop. Prot.** 20: 767-778.
- Fargues J., Bon M.C., Manguin S. y Couteaudier Y. 2002. Genetic variability among *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from various geographical and host insect origins based on the rDNA-ITS regions. **Mycol. Res.** 106: 1066-1074.
- Fargues J., Vidal C., Smits N., Rougier M., Boulard T., Mermier M., Nicot P., Reich P., Jeannequin B., Ridray G. y Lagier J. 2003. Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato. **Biol. Control.** 28: 320-331.
- Ferron P. 1985. Fungal control. En: Kerkut G.I y Gilbert L.I. (Eds.). Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford, Pergamon. 4: 313-346.
- Fransen J.J., Winkelman K. y Van Lenteren J.C. 1987. The differential mortality of various life stages of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae), by infection with the entomopathogenic fungus

- Aschersonia aleyrod* (Deuteromycotina: Coelomycetes). **J. Invertebr. Pathol.** 50: 158-165.
- Fuxa J. 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. **Ann. Rev. Entomol.** 32: 225-251.
- Gams W., Hodge K.T., Samson R.A., Korf R.P. y Seifert K.A. 2005. Proposal to conserve the name *Isaria* (anamorphic fungi) with a conserved type. **Taxon.** 52(12): 537.
- Garza Gonzalez E. 1993. Enemigos naturales de acción microbiana de mosquita blanca. En: Rodriguez del Bosque L.A. (Ed.). Proceedings, II Taller sobre Control Biológico de Mosquita Blanca. SARH, Sinaloa, México. pp.54–56.
- Gerk A.O., Vilela E.F., Pires C.S. y Eiras A.E. 1995. Biometria e ciclo de vida da mosca branca *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.) e aspectos da orientacao do seu parasitoide *Encarsia formosa* (Gahan.). **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil.** 24: (1): 89-97.
- Gerling D. 1990. Natural enemies of whitefly: predators and parasitoides. Cap 7. En: Gerling D. (Ed.). Whiteflies: Their bionomics, Pest Status and Management. Intercepted, Andover, United Kingdom.
- Gerling D. 1992. Approaches to the biological control of whitefly. **Fla. Entomol.** 75(4): 446-456.
- Gill R.J. 1990. The morphology of whiteflies. En: Gerling D. (Ed.). Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management. Intercept Ltd. Wimborne, United Kingdom. pp. 13-46.
- Gillespie A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. En: Burge M. (Ed.). Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, England. 269 pp.
- Gindin G., Geschtovt N.U., Raccach B. y Barash I. 2000. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolli*. **Phytoparasitica.** 28 (3): 229-239.
- Glare T.R. 2004. Molecular characterization in the entomopathogenic fungal genus *Beauveria*. Laimburg Journal, 1, 286-298.
- Goettel M.S. 1984. A simple method for mass culturing entomopathogenic *Hyphomycete* fungi. **J. Microbiol. Met.** 3: 15-20.
- Goettel M.S. y Inglis G.D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. En: Lacey L. (Ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology. San Diego, California. pp. 213-248.

- Goettel M.S. y Robert D.W. 1991. Mass production formulations and field applications of entomopathogenic fungi. En: Lomer C.J. y Prior C. (Eds.). Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, U.K. pp. 230-238.
- Gokce A. y Er M.K. 2005. Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the Glasshouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with some observations on the fungal infection process. **Turk. J. Agric. For.** 29: 331-339.
- Gold C. y Altieri M. 1989. The effects of intercropping and mixed varieties of predators and parasitoids of cassava whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) in Colombia. **Bull. Ent. Res.** 79: 115-121.
- Gonsebatt G., Salate S., Viscarret M. y Lietti M. 2005. Determinación de especies de moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) en cultivos y malezas asociadas en el Cinturón Hortícola de Rosario. En: Resúmenes VI Congreso Argentino de Entomología. San Miguel de Tucumán.
- González E., Palenzuela I. y Argudín Z. 1995. Efecto del Bayleton y del Oxiclورو de cobre en el crecimiento micelial y la germinación *in vitro* de *Verticillium lecanii*. **Revista de Protección Vegetal.** 10: 13-18.
- Hajek A.E. 2005. Natural enemies. An introduction to biological control. Ed. Cambridge University Press. London.
- Hajek A.E y Delalibera I. 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **BioControl.** 55:147-158.
- Hall R.A. 1981. Laboratory studies on the effects of fungicides, acaricides and insecticides on the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*. **Entomol. Exp. Appl.** 29: 39-48.
- Hall R.A., Peterkins D y Ali B. 1994. Fungal control of whitefly, *Thrips palmi* and sugarcane froghopper in Trinidad and Tobago. En: Proceeding, VI International Colloquium of Invertebrate Pathology, Montpellier, France. pp. 277-282.
- Heinz K.M., Brazzle J.R., Picket C.H., Natwick E.T, Nelson J.M y Parrella M.P. 1994. Predatory beetle may suppress silverleaf whitefly. **California Agriculture.** 48: 35-40.
- Herrera F., Carballo M. y Shannon P. 1999. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bemisia tabaci*, en el laboratorio. **Manejo Integrado de Plagas.** 54:37-43.
- Hibbett D.S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. **Trans. Mycol. Soc. Jap.** 33: 533-556.

- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lucking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., Matheny P.B., Mc Laughlin D.J., Powell M.J., Redhead S., Schoch C.L., Spatafora J.W., Stalpers J.A., Vilgalys R., Aime M.C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G.L., Castlebury L.A., Crous P.W., Dai Y., Gams W., Geiser D. M., Griffith G.W., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Koljalg U., Kurtzman C.P., Larsson K., Lichtwardt R., Longcore J., Mia Dlikowska J., Miller A., Moncalvo J., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J.D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J.P, Schuëbler A., Sugiyama J., Thorn R.G., Tibell L., Untereiner W.A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M.M, Winka K., Yao Y., Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol. Res.** 3: 509 – 547.
- Hilje L. 2002. Manejo de *Bemisia tabaci* en América Central y el Caribe: la experiencia de un decenio. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)**. 65:102-108.
- Hodge K.T. 2006. Clavicipitaceous anamorphs. Dekker Reprint Program.
- Hodge K.T., Gams W., Samson R.A., Korf R.P. y Seifert K.A. 2005. Lectotypification and status of *Isaria* Pers.: Fr. **Taxon**. 52: 485-489.
- Hodge K.T. 2003. Clavicipitaceous Anamorphs. En: White JF, Bacon CW, Hywel Jones N.L. y Spatafora JW (Eds.). Clavicipitaceous fungi, evolutionary biology, chemistry biocontrol and cultural impacts. Marcel Dekker, NY.
- Hodges G.S. y Evans G.A. 2005. An identification guide to the whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the Southeastern United States. **Fla. Entomol.** 88(4): 518-534.
- Hoelmer K.A., Osborne L.S y Yokomi R.K. 1994. Interactions of the whitefly predator *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) with parasitized sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). **Environ. Entomol.** 23: 136-139.
- Horowitz A.R. 1986. Population dynamics of *Bemisia tabaci* (Gennadius) with special emphasis on cotton fields. **Agric. Ecol. Environ.** 17: 37-47.
- Humber R.A. 1984. Foundations for an evolutionary classification of the Entomophthorales (Zygomycetes). En: Wheeler Q, Blackwell M, eds. Fungus-insect relationships. New York: Columbia University Press.
- Humber R.A. 1997. Fungi: Identification. En: Manual of Techniques in Insect Pathology. Ed. L. Lacey. Academic Press. San Diego, California. pp. 53-185.

- Humber R.A. 2002. Collection of entomopathogenic fungal cultures, US, Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS. pp. 110-177.
- Hussey N.W. y Scopes N. 1985. Biological pest control. The glasshouse experience. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Ignoffo C.M. 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* as microbial insecticide. En: Burges H.D (Ed.). Microbial control of pest and plant diseases. London, Academic Press. pp. 513-538.
- 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(1): 132-136.
- Jaronsky S.T. 1986. Commercial development of Deuteromycetous fungi of Arthropods: A critical appraisal. En: International Colloquium of Invertebrate Pathology, 4°, Wageningen, 1986. Fundamental and applied Aspect of Invertebrate Pathology. Samson R.A., Vlask J.M y Peters D. (Eds.). pp. 653-656.
- Jenkins N.E., Heviefo G., Langewald J., Cherry A.J., Lomer C.H.J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information.**19: 21-31.
- Jensen A.B y 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.** 103(3): 307-312.
- Johnson D.W., Kish L.P. y Allen G.E. 1976. Field Evaluation of selective pesticide on the natural development on entomopathogen, *Nomuraea rileyi*, on the Velvetbean Caterpillar in Soybean. **Environ. Entomol.** 5(5): 964-966.
- Joslyn D.J y Boucias D.G. 1980. Isoenzyme differentiation among three pathotypes of entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. **Can. J. Microbiol.** 27: 364:366.
- Kapadia M.N. y Puri S.N. 1990. Feeding behaviour of *Chrysoperla carnea* (Stephens) on the parasized pupae of *Bemisia tabaci* (Gennaidus). **Entomon.** 15: 283-284.
- Kapadia M.N. y Puri S.N. 1991. Biology and comparative predation efficacy of three heteropteran species recorded as predators of *Bemisia tabaci* in Maharashtra. **Entomophaga.** 36: 555-559.
- Kennedy A.C. y Gewin V.L. 1997. Soil Microbial Diversity: Present and future considerations. **Soil Science.** 162: 607-617.

- Kogan M. 1998. Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. **Annu. Rev. Entomol.** 43: 243-270.
- Koul O. y Dhaliwal G.S. 2003. Predators and parasitoids. En: Koul O. y Dhaliwal G.S. (Eds.). Taylor y Francis. London, England. 191 pp.
- Lacey L.A. y Brooks W.M. 1997. Manual of techniques in insect pathology. Ed. Lacey L.A., Academic Press Inc., San Diego, California. USA.
- Lacey L.A., Fransen J.J. y Carruthers R. 1996. Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents. En: Gerling y Mayer (Eds.). *Bemisia: taxonomy, Biology, Damage, and Management*. Intercept, Andover, U.K. pp. 401-433.
- Lacey L.A., Kirk A.A. y Hennessey R.D. 1993. Foreign exploration for natural enemies of *Bemisia tabaci* and implementation in integrated control programs in the United States. En: Proceedings ANPP International Conference Pest of Agriculture.1: 351-360.
- Lacey L.A., Kirk A.A., Millar L., Mercadier G. y Vidal C. 1999. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae): Description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. **Biocontrol Sci. Techn.** 9: 9-18.
- Lacey L.A., Mesquita A.L.M. Mercadier G., Debire R., Kazmer D.J. y Leclant F. 1997. Acute and sublethal activity of the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*, (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on adults *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Environ. Entomol.** 26: 1452-1460.
- Lacey L.A., Wraight S.P. y Kirk A.A. 2007. Entomopathogenic fungi for control of *Bemisia* spp.: foreign exploration, research and implementation. Cap 3. En: Gould J., Goolsby J. y Hoelmer K. (Eds.). Classical Biological Control of Sweetpotato whitefly (Biotype B): Research, implementation of a National Five-Year Plan. USDA, Agriculture Research Service Publication.
- Landa Z., Osborne L., López F. y Eyal J. 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. **Biol. Control.** 4: 341-350.
- Lane B.S., Humphreys A.M., Thompson K. y Trinci A.P.J. 1988. ATP content of stored spores of *Paecilomyces farinosus* and the use of ATP as a criterion of spore viability. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 90:109-148.

- Latge J.P y Boucias D.G. 1984. Intraespecific variability in *Conidiobolus obscurus*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 30: 135-150.
- Lecuona RE. 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Ed. Buenos Aires, Argentina: Talleres gráficos Mariano Mas.
- Lecuona, R. E. 1999. Control microbiano con hongos entomopatógenos en la Argentina. **Rev. Soc. Entomol. Arg.** 58(1-2): 301-306.
- Leite G.L.D, Picanço M., Jham G.N. y Moreira M.D. 2004. Natural Factors influencing whitefly attack in tomato. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 71 (2): 245-248.
- López-Avila A., Cardona Mejia C., Garcia Gonzalez J., Rendon F. y Hernandez P. 2001. Reconocimiento e identificación de enemigos naturales de moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en Colombia y Ecuador. **Revista Colombiana de Entomología.** 27(3-4): 137-141.
- López Lastra C.C. 1988. Nuevas especies de insectos hospedadores para el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en Argentina y consideraciones sobre su patogenia. **Rev. Fac. Agr. UNLP.** Tomo LXIV (entregas 1 y 2).
- López Lastra C.C. 1989. Primera cita de *Cordyceps sobolifera* (Ascomycotina: Pyrenomycetes) patógeno de insectos en la República Argentina. **Bol. Soc. Arg. Bot.** 26(1-2): 59-60.
- López Lastra C.C. 1990. Primer registro de *Aphanocladium album* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) como patógeno de insectos en la República Argentina. **Bol. Soc. Arg. Bot.** 26(3-4): 259-260.
- López Lastra C.C. y Scorsetti A.C. 2006. Hongos Entomophthorales patógenos de insectos de la República Argentina. **Revista de Biología Tropical.** 52 (4): 311-315.
- López Lastra C.C. y Scorsetti A.C. 2007. Revisión de los hongos Entomophthorales (Zygomycota: Zygomycetes) patógenos de insectos de la República Argentina. **Bol. Soc. Bot. Arg.** 42(1-2): 33-37.
- López S.N., Viscarret M.M. y Botto E.N. 1999. Selección de la planta hospedera y ciclo de desarrollo de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) sobre zapallito (*Cucurbita maxima* Duch.; Cucurbitales: Cucurbitaceae) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.; Tubiflorales: Solanaceae). **Bol. San.Veg. Plagas.** 25: 21-29.

- Lourenção A.L., Miranda M.A.C. y Alves S.B. 2001. Ocorrência epizotica de *Verticillium lecanii* em *Bemisia tabaci* biotipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) no Estado do Maranhão, Brazil. **Neotropical Entomology**. 30(1):183-185.
- Luangsa-ard J.J., Hywel-Jones N.L., Manoch L., Samson R.A. 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. **Mycol. Res.** 109: 581-589.
- Luangsa-ard J.J., Hywel-Jones N.L., Samson R.A. 2004. The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* based on 18S generated rDNA phylogeny. **Mycologia**. 96: 773-780.
- Marchionatto J.B. 1934. Algunos hongos entomopatógenos comunes en la República Argentina y las posibilidades de su aplicación agrícola. **Rev. Fac. Agr. y Vet. Univ. Buenos Aires**. 7: 571-584.
- Martin J.H. 1987. An identification guide to common whitefly pest species of the world (Homoptera: Aleyrodidae). **Tropical Pest Management**. 33: 298-322.
- Martínez Quintana O. y Balcaza L.F. 2008. Situación del cultivo de tomate en la Región Hortícolas de La Plata. **Boletín electrónico de tomate**. 12: 2-3.
- Mc Coy C., Samson R. y Boucias D. 1988. Entomogenous Fungi. En: Ignoffo C. (Ed.) CRC Handbook of Natural pesticides. Vol. 5, Part. A. CRC Press Boca Raton Fl. 151-236.
- Meade D. y Byrne D.S. 1991. The use of *Verticillium lecanii* against subimaginal instars of *Bemisia tabaci*. **J. Invertebr. Pathol.** 57: 296-298.
- Meyer W., Koch A., Niemann C., Beyermann B., Epplen J.T. y Börner T. 1991. Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. **Curr. Genet.** 19: 239-242.
- Meyling N.V. PCR-based characterization of Entomopathogenic fungi for ecological studies. 2008. Deliverable 5.2 from VegQure. Department of Agriculture and Ecology Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark.
- Michaud J.P y Grant A.K. 2003. Sub-lethal effects of a copper sulfate fungicide on development and reproductive in three coccinellid species. **J. Insect Sci.** 3: 16.
- Mochi D.A., Monteiro A.C., De Bortoli S.A., Doria H.O.S y Barbosa J.C. 2006. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. **Neotropical Entomology**. 35(3): 382-389.

- Moino Jr. A. y Alves S.B. 1999. Efeito antagônico de *Trichoderma* sp. no desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Viull. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Scientia Agricola**. 56 (1): 217-224.
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. **Manejo Integrado de Plagas** (Costa Rica). 63: 95-103.
- Morrill A.W. y Back E.A. 1912. Natural control of whiteflies in Florida. United States Department of Agriculture, Bureau of Entomology Bulletin. 102: 1-78.
- Mound L.A. y Halsey, S.H. 1978. Whitefly of the World: A systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with Host plant and Natural Enemy data. British Museum (Natural History). 340pp.
- Mullis F., Falcoma F., Scharf S., Snikl R., Horm G. y Erlich H. 1986. PCR a practical approach. Oxford University Press, Oxford.
- Muniyappa V. 1980. Whiteflies. En: Harris K.F. y Maramorosh K. (Eds.) Vectors of plant pathogens. Academic Press, New York. pp. 39-85.
- Murrin F. 1996. Fungi and insects. En: Howard D.H. y Miller J.D. (Eds.). The Mycota VI. Human and Animal Relationship. Springer- Verlag Berlin Heidelberg. pp. 365-388.
- Myartseva S.N. 2006. *Eretmocerus* Haldeman (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitoids of whiteflies *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* (complex) in Mexico, with a key and description of a new species. **Vedalia**. 13 (1): 27-38.
- Negasi A., Parker B.L. y Brownbridge M. 1998. Screening and bioassay of entomopathogenic fungi for the control of silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Insect Sci. Appl.** 18: 37-44.
- Noldus L.P.J.J., Xu Rumei, Eggenkamp-Rotteveel Mansveld M.H. y Van Lenteren J.C. 1986. The parasite-host relationship between *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera; Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera; Aleyrodidae). XX. Analysis of the spatial distribution of greenhouse whiteflies in a large glasshouse. **J. Appl. Entomol.** 102: 484-498.
- Obornik M., Stouthamer R., Meekes E. y Schilthuitzen M. 1999. Molecular characterization and phylogeny of the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. **Plant Protect. Sci.** 35: 1-9.
- Olmert I. y Kenneth R.G. 1974. Sensitivity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* and *Verticillium* spp. to fungicides and insecticides. **Environ. Entomol.** 3(1): 33-38.

- Ortega Arenas L.D. 1998. Resistencia de *Bemisia argentifolii* a insecticidas: implicancias y estrategias de manejo en México. **Manejo Integrado de Plagas** (Costa Rica). 49:10-25.
- Osborne L.S. y Landa Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. **Fla. Entomol.** 75: 456-471.
- Osborne L.S. y Landa Z. 1994. Utilization of the entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. International Organization of Biological Control Western Palearctic Regional Section Bulletin 17: 201-206.
- Osborne L.S., Storey G.K., McCoy C.W. y Walter J.F. 1990. Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. Proceedings of the V International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. pp. 386-390. August 20-24, 1990, Adelaide, Australia, Society for Invertebrate Pathology, Knoxville, TN.
- Osman I.G. 1971. The whitefly Eggs and First Larval Stages as Prey for certain Phytoseiid Mites. **Rev. Zool. Bot. Afr.** 84: 79-82.
- Palumbo J.C., Horowitz A.R. y Prabhaker N. 2001. Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. **Crop Protection.** 20(9): 739-765.
- Papierok B. y Hajek AE. 1997. Fungi: Entomophthorales. En: Lacey L, (Ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. San Diego, California: Academic Press. pp. 187-211.
- Papierok B. 2007. Isolating, growing and storing arthropod pathogenic Entomophthorales. En: Keller S. (Ed.) Arthropod-pathogenic Entomophthorales: biology, ecology; identification. COST Action 842. Luxembourg. pp 66–81.
- Pell J.K., Eilenberg J., Hajek A.E., Steinkraus D.C. 2001. Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. En: Butt T.M., Jackson C.W., Magan N. (Eds.) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI International, Oxon. pp. 71–153.
- Pérez Moreno I. 2000. Fundamentos teóricos del manejo integrado de plagas. **Rev. Entomología Aplicada.** 27: 127-133.
- Perring M.T., Cooper A.D., Rodríguez R.J., Farrar C.A. y Bellows J.S. 1993a. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. **Science.** 259: 74-77.

- Perring M.T., Farrar C.A., Bellow T.S., Cooper A.D. y Rodriguez R.J. 1993b. Evidence for a new Species of Whitefly: UCR findings and implications, California Agriculture, University of California USA.
- Perry D.F. y Latgé J.P. 1983. The effect of eight fungicides on Germination of *Conidiobolus obscurus* resting spores. **J. Invertebr. Pathol.** 42: 83-86.
- Peterlin O.A. 1999. Dinámica poblacional de moscas blancas. X Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Jujuy.13-14 pp.
- Peterlin O.A y Helman S. 1994. Some aspects of the population dynamics of *Bemisia tabaci* as a cotton pest in Santiago del Estero, NW Argentina. Abstracts of the International Bemisia Workshop. Shores Israel.
- Ploper L.D., Rodríguez Pardina P., Laguna I., Truol G., Hanada K., Rivas Platero G., Ramirez P. y Herrera P. 1998. Presencia de un geminivirus en cultivos de soja del Noroeste Argentino. EEAOC - Avance Agroindustrial. pp. 38-41.
- Polack L.A. 2005. Manejo Integrado de Moscas Blancas. Boletín Hortícola. 31: 23-30.
- Polack L.A. y Mitidieri M. 2005. Producción de tomate diferenciado. Protocolo preliminar de manejo integrado de plagas y enfermedades. Edición: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). San Pedro, Buenos Aires, Argentina.
- Polaszek A., Evans G.A. y Bennett F.D. 1992. *Encarsia* parasitoids of *Bemisia tabaci* (Hymenoptera: Aphelinidae, Homoptera: Aleyrodidae): A preliminary guide to identification. **Bull. Entomol. Res.** 82: 375-392.
- Polston J.E. y Anderson P.K. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* 81: 1358–1369.
- Poprawski T.J., Legaspi J.C. y Parker P.E. 1998. Influence of entomopathogenic fungi on *Serangium parcesetosum* (Coleoptera: Coccinellidae), an important predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). **Environ. Entomol.** 27: 785-795.
- Poprawski T.J. y Jones W.A. 2000. Host plant effects on activity of the mitosporic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosorosea* against two populations of *Bemisia* whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). **Mycopathologia.** 151: 11-20.
- Poprawski T.J., Riba G., Jones W.A. y Aioun A. 1988. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona weevils* (Coleoptera: Curculionidae). **Environ. Entomol.** 17: 275-279.

- Poprawski T.J y Majchrowicz I. 1995. Effects of herbicides on in vitro vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. **Crop Prot.** 14 (1): 81-87.
- Quaintance A.L., Baker A.C. 1913. Classification of the Aleyrodidae. Part. 1. Technical Series. United States Department of Agriculture Bureau of Entomology. 27: 1-93.
- Quaintance AL, Baker AC. 1914. Classification of the Aleyrodidae. Part. 2. Technical Series. United States Department of Agriculture Bureau of Entomology. 27: 94-109.
- Ramaraje N.V., Govindu H.C. y Shivashankara K.S. 1967. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.** 9(3): 398-403.
- Ramos E.Q., Alves S.B., Tanzini M.R. y López R.B. 2000. Susceptibilidad de *Bemisia tabaci* a *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio. **Manejo integrado de plagas** (Costa Rica). 56: 65-69.
- Ravensberg W.J. 1994. Biological Control of pest current trends and future prospects. En: Brighton Crop Protection Conf, Pest and Diseases, Brighton Crop Protection Council Franham. pp. 591-600.
- Reddy M.P, Sarla N. y Siddiq E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphyt.** 128: 9-17.
- Rehner S.A. y Buckley E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia.** 97(1): 84-98.
- Roberts D.W. y Sweeney A.W. 1982. Production of fungi imperfecti with vector control potential. En: International Colloquium on Invertebrate Pathology, 3°. Brighton, Proceedings. pp. 409- 413.
- Roberts D.W. y Hajek A.E. 1992, Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. En: Leatham G.F (Ed.). *Frontiers in industrial mycology*. Chapman y Hall, London. pp. 144-173.
- Rodríguez Dos Santos A. y Del Pozo Núñez E. 2003a. Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. **Agrociencia.** 7(2): 71-78.
- Rodríguez Dos Santos A. y Del Pozo Núñez E. 2003b. Alternativa para el manejo integrado de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood en tomate orgánico en Uruguay. **Bol. San. Veg. Plagas.** 29: 211-218.

- Romero F. 2004. Manejo Integrado de Plagas: las bases, los conceptos y su mercantilización. Chapingo, Tezcoco, México. 109 pp.
- Russell L.M. 1948. The North American species of whiteflies of the genus *Trialeurodes*. Miscellaneous Publications of the United States Department of Agriculture. 635: 85.
- Russell L.M. 1957. Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). **Bull. Brooklyn Entomol. Soc.** 52: 122–123.
- Russell L.M. 1977. Hosts and distribution of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Homoptera: Aleyrodidae) US. Dep Agric Coop Plant Pest Rep. 2(25): 449-458.
- Saini E.D. y Alvarado L. 2006. Publicación del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola n°1. INTA Castelar.
- Samson R.A., Evans H.C. y Latgé J.P. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Ed. Springer-Verlag, Berlin. 300pp.
- Samson R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Study in Mycology. N° 6.
- 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.
- Santiago-Álvarez C., Maranhao E. y Quesada-Moraga E. 2006. Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* and its sporulations on cadavers. **Biocontrol.** 51: 519-532.
- Sapieha-Waszkiewicz A., Marjanska-Cichon B. y Mietkiewski R. 2004. The effect of fungicides applied in apple orchards on entomopathogenic fungi in vitro. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities.** 7(1): #4.
- Scorsetti A.C. 2007a. Estudios relativos a los hongos patógenos de insectos plaga en cultivos hortícolas como potenciales agentes de control biológico. Trabajo de tesis doctoral. FCNyM, UNLP, La Plata, Buenos Aires, República Argentina. 151 pp.
- Scorsetti A.C., García J.J., Humber R.A. y López Lastra C.C. 2007b. Natural occurrence of entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) of aphid (Hemiptera: Aphididae) pests of horticultural crops in Argentina. **BioControl.** 52: 641-655.

- Scorsetti A.C, Humber R.A, De Gregorio C. y López Lastra C.C. 2008. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*, pests of horticultural crops, in Argentina. **BioControl**. 53: 787-796.
- Shah P.A. y Pell J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 61: 413-423.
- Smith M.T y Hardee D.D. 1996. Influence of fungicide on development of an Entomopathogenic fungus (Zygomycetes: Neozygitaceae) in the Cotton Aphid (Homoptera: Aphididae). **Environ. Entomol.** 25(3): 677-687.
- Sosa-Gómez D.R. 1999. Estado actual del control biológico de plagas agrícolas con hongos entomopatógenos. **Rev. Soc. Entomol. Arg.** 58(1-2): 307-311.
- Sosa-Gómez D.R y Alves S.B. 1983. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. I. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. **CIRPON Rev. Invest.** 1(3): 83-102.
- Sosa-Gómez D.R y Alves S.B. 1984. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorok. II. Producción de conidios en diferentes medios de cultivo y sobre cadáveres de larvas de *Diatraea saccharalis* (F.) **CIRPON Rev. Invest.** 2(1-2): 5-25.
- Sosa-Gómez D.R., Da Silva J. 2002. Fungos Entomopatogênicos: Catalogo de isolados. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento, EMBRAPA Soja., Londrina, Brasil.
- Sosa-Gómez D.R., Delpin K.E., Moscardi F. and Márcia DE H. Nozaki. 2003. The Impact of Fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Epizootics and on Populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on Soybean. **Neotropical Entomology**. 32(2): 287-291.
- Sosa-Gómez D.R., López Lastra C.C. y Humber R.A. 2010. An overview of Arthropod-Associated Fungi from Argentina and Brazil. **Mycopathologia**. 170: 61-76.
- Sosa-Gómez D.R. y Moscardi F. 1991. Microbial control and insect pathology in Argentina. **Ciencia e cultura**. 43(5): 375-379.
- Sparks T.C. and Sparks A. 1987. Micro Probit. DowElanco, GreenPeld, IN.
- St. Leger R.J., Charnley A.K. y Cooper R.M. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. **J. Invertebr. Pathol.** 47: 295-302.

- St. Leger R.J., Allee L.L., May B., Staples R.C. y Roberts D.W. 1992. World-wide distribution of genetic variation isolates of *Beauveria* spp. **Mycol. Res.** 96: 1007-1015.
- Stevens RB. 1974. Mycology Guidebook. Seattle: University of Washington.
- Storey G.K. y Gardner W.A. 1986. Sensitivity of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* to selected plants growth regulators and spray additives. **App. Environ. Microb.** 52(1): 1-3.
- Strassera M.E. 2006. Características bioecológicas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) y su peligrosidad como plaga en el cultivo de Pimiento. **Boletín Hortícola.** 33:35-39.
- Strassera M.E., Polack L.A., Mezquiriz N.B. y Martínez Quintana O.R. 2007. Evaluación de diferentes tratamientos para el control de la “mosca blanca de los invernáculos” *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) en tomate bajo cubierta en el Cinturón Hortícola Platense. Libro de resúmenes del 30° Congreso Argentino de Agricultura. pp 78.
- Strassera M.E. 2009. Análisis de la sustentabilidad de tres alternativas de manejo de plagas en tomate bajo cubierta en el Cinturón Hortícola Platense. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata., La Plata, Buenos Aires, República Argentina.
- Sung G.H, Hywel-Jones N.L., Sung J.M., Luangsa-ard J.J., Shreshtha B. y Spatafora J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous fungi. **Stud. Mycol.** 57: 5-59.
- Tanada Y. y Kaya H. 1993. Insect Pathology. Academic Press, San Diego, California, USA. 666pp.
- Teich Y. 1966. Mites of the family Phitoseiidae as predators of the tobacco whitefly, *Bemisia tabaci* Gennadius. **Israel J. Agric. Res.** 16: 141-142.
- Tigano-Milani M.S., Gomes A.C.M.M. y Sobral B.W.S. 1995a. Genetic Variability among Brazilian Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.** 65: 206-210.
- Tigano-Milani M.S., Honeycutt H.J., Lacey L.A., Assis R., Mc-Clelland M. y Sobral B. W.S. 1995b. Genetic variability *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. **J. Invertebr. Pathol.** 65: 274–282.
- Toledo A.V., Giambelluca L., Marino de Remes Lenicov A.M. y López Lastra C.C. 2008. Pathogenic fungi of planthoppers associated with rice crops in Argentina. **Int. J. Pest Manage.** 54 (4): 363-368.

- Toledo A.V., Scorsetti A.C., Dikgolz V.E. y López Lastra C.C. 2004 *Paecilomyces fumosoroseus* y *Nomuraea rileyi* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), hongos patógenos de insectos plaga de la agricultura en la Argentina. **Bol. Soc. Arg. Bot.** 39(1-2): 21-26
- Truol G., Laguna G.L., Pardinas R.P., Schenone M., Nakagaki S. y Usughi T. 1998. Ajuste de cría artificial de *Bemisia tabaci* Gennadius y transmisión del geminivirus (grupo III) de la soja, presente en el noroeste argentino. J. C. Mercado Resúmenes del VII Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas, VII Taller Latinoamericano de Moscas Blancas y Geminivirus, XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología, División Caribe APS-CD, 26–30 Octubre 1998. 199-Managua Nicaragua.
- Tzean S.S., Hsieh L.S. y Wu W.J. 1997. Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan. Council of Agriculture, Executive Yuan.
- Van De Mereredonk S. y Van Lenteren J.C. 1978. Determination of mortality of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) eggs, larvae and pupae on four host-plant species: eggplant (*Solanum melongena* L.), cucumber (*Cucumis sativus* L.), tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and paprika (*Capsicum annuum* L.). **Med Fac. Landbouww. Rijksuniv Gent.** 43 (2): 421-429.
- Van de Veire M., Sterk G. y Tirry L. 2004. Ovicidal and nymphicidal effects of some fungicides on the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. **Phytoparasitica.** 32 (3): 218-220.
- Van Lenteren J.C. 2000. Success in biological control of arthropods by augmentation of natural enemies. En: Gurr G. y Wratten S. (Eds.). Biological control: measures of success. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherland. pp.77-103.
- Van Lenteren J.C. y Bueno V.H.P. 2003. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. **BioControl.** 48: 123-139.
- Van Lenteren J.C. y Martín N. 2001. Biological control of whiteflies. p. 202-214. En: Albajes R., Gullino M.L, Van Lenteren J.C y Elad Y. (Eds.) Integrated pest disease management in greenhouse crops. Kluwer Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Van Lenteren J.C. y Woets J. 1998. Biological and integrated pest control in greenhouses. **Ann. Rev. Entomol.** 33: 239-269

- Van Sas J., Woets J. y Van Lenteren J.C. 1978. Determination of host quality of gherkin (*Cucumis sativis* L.), melon (*Cucumis melo* L.) and gerbera (*Gerbera jamesonii* Hook) for the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). **Med Fac. Landbouww. Rijksuniv Gent.** 43 (2): 409-420.
- Vega E.F. y Blackwell M. 2005. Insect fungal associations. Ecology and Evolution. Oxford University Press, Inc. USA.
- Vélez P., Posada F., Marin P., González M., Osorio E. y Bustillo A. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café Pedro Uribe Mejía. CENICAFE. Chinchiná, Caldas, Colombia. 37 p.
- Vet L.E., Van Lenteren J.C. y Woets J. 1980. The parasite-host relationship between *Encarsia Formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). IX. A review of the biological control of greenhouse whitefly with suggestions for future researchs. **J. Appl. Entomol.** 90: 26-51.
- Vidal C., Lacey L.A. y Fargues J. 1997. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. **J. Econ. Entomol.** 90: 765-772.
- Vidal C., Osborne L.S, Lacey L.A y Fargues J. 1998. Effect of host plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in greenhouses. **Biol. Control.** 12:191-199.
- Villacarlos L.T., Mejia B.S. y Keller S. *Entomophthora leyteensis* Villacarlos & Keller sp. nov. (Entomophthorales: Zygomycetes) infecting *Tetraleurodes acaciae* (Quaintance) (Insecta, Hemiptera: Aleyrodidae), a recently introduced whitefly on *Gliricidia septium* (Jaq.) Walp. (Fabaceae) in the Philippines. **J. Invertebr. Pathol.** 83: 16-22.
- Viscarret M.M. 1999. La situación actual de las moscas blancas en Argentina: perspectivas de manejo. VII Taller Latinoamericano y del Caribe de Moscas Blancas y Geminivirus. Brasil. 17 al 20 de octubre. 10 pp.

- Viscarret M.M. y Botto E.N. 1996. Descripción e identificación de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera, Homoptera: Aleyrodidae). **Revista Chilena de Entomología**. 23: 51-58.
- Viscarret M.M. y Botto E.N. 1997. Número, tiempo de desarrollo y supervivencia de estadios inmaduros de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) en berenjena (*Solanum melongena*, Solanaceae). **Bol. San. Veg. Plagas**. 23: 535-539.
- Viscarret M.M., Botto E.N. y Polaszek A. 2000. List of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) of economic importance and their natural enemies (Hymenoptera: Aphelinidae) in Argentina. **Revista Chilena de Entomología**. 26: 5-11.
- Wang S.B., Miao X.X., Zhao W.G., Huang B., Fan M.Z., Li Z.Z. y Huang Y.P. 2005. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **Mycol. Res.** 109: 1364-1372.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press. pp. 315-322.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. y Tingey S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** 18: 6531-6535.
- Williams T. y Polaszek A. 1996. A re-examination of host relations in the Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Biol. J. Linn. Soc.** 57: 35-45.
- Wintermantel W.M. 2004. Emergence of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) transmitted criniviruses as threats to vegetable and fruit production in North America. APS Net Plant Pathology Online.
- Woets J. y Van Lenteren J.C. 1976. The parasite-host relationship between *Encarsia Formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). VI. The influence of the host plant on the greenhouse whitefly and its parasite *Encarsia Formosa*. **Bull. O.I.L.B./S.R.O.P.** 76: 125-137.
- Wraight S.P. 1997. Evaluation of entomopathogenic fungi in field crops: methods for research and development. En: Hacia un Futuro Agrícola Sostenible, XX

- Congreso Nacional de Control Biológico, pp. 241-24. 13 y 14 de noviembre de 1997, Guadalajara, México.
- Wraight S.P., Carruthers R.I., Jaronsky S.T., Bradley C.A., Garza C.J. y Galaini-Wraight S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycol. Res.** 101: 35-41.
- Wraight S.P., Carruthers R.I., Bradley C.A., Jaronski S.T., Lacey L.A., Wood P. y Galaini-Wraight S. 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **J. Invertebr. Pathol.** 71:217-226.
- Wright J.E., Bouse L.F., Kirk I.W., Carlton J.B., Franz E., Latheef M.A y Rektorik R. 1993. Full season control of cotton insects in the Rio Grande Valley of Texas with Naturalis-L; an insect specific fungus. Proc. Beltwide Cotton Conf. 2: 849-855.
- Yasem de Romero M. 1984. Primera cita de *Cordyceps dipterigena* Berck. & Br. (= *Hymenostilbe dipterigena* Petch) para la República Argentina. **CIRPON Rev. Invest.** 2(1-2): 65- 69.
- Zietkiewicz E.; Fafalski A. y Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics.** 20: 176-183.

ANEXO



ANEXO

Medios de cultivos:

- **AGAR EXTRACTO DE MALTA 2% (MEA)** (Stevens, 1974)
 - Agar-agar 20g
 - Extracto de malta 20g
 - Peptona de carne 1g
 - Dextrosa 20g
 - Agua destilada 1litro

- **SABOURAUD DEXTROSA AGAR con 1% de extracto de levadura (SDYA)** (Goettel e Inglis, 1997)
 - Peptona 10g
 - Dextrosa 20g
 - Agar 20g
 - Extracto de levadura 10g
 - Agua destilada 1 litro

- **MEDIO SELECTIVO PARA AISLAR *Beauveria bassiana* y *M. anisopliae* DESDE MUESTRA DE SUELO** (Doberski y Tribe, 1980)
 - Glucosa 40g
 - Peptona (Difco) 10g
 - Agar 15g
 - Cristal violeta 0,01g
 - Cycloheximida 0,25g
 - Dodine (acetato de N-dodecilguanidinio) 0,25g
 - Cloranfenicol 0,5g
 - Agua destilada 1litro

Los antibióticos y antifúngicos se agregan al medio después de esterilización por autoclave cuando el medio está aún líquido a una temperatura por debajo de los 60 °C.

Antibióticos:

- Cloranfenicol 250mg/50ml agua destilada estéril.
- Gentamicina 25mg/50ml agua destilada estéril.

Ambos antibióticos fueron esterilizados por filtrado a través de filtros de 20 μ m de diámetro (Fisherbrand). Usar 0,1ml de antibiótico por cada 100ml de medio de cultivo.

Colorantes:**Azul de algodón-Lactofenol de Amann (Stevens, 1974):**

-Fenol (cristales)	20g
-Acido láctico	20g (16ml)
-Glicerol	40g (31 ml)
-Azul de algodón	0,05-1g
-Agua destilada	20g (20ml)



Lic. D'Alessandro Celeste P.

Tesista



Dra. López Lastra Claudia C.

Directora



Dr. Sosa-Gómez Daniel R.

Co-director