

Control microbiano de la chinche de la panoja del arroz: *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851), mediante el empleo de hongos entomopatógenos

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

Rampoldi Andrés

Ingeniero Agrónomo – Universidad de Concepción del Uruguay (UCU) - 2010

Lugar de trabajo:

- Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Concepción del Uruguay (FCA-UCU)
- Estación Experimental Agropecuaria Concepción del Uruguay – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Concepción del Uruguay – INTA)
- Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA - CICVyA - INTA Castelar)



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

COMITÉ CONSEJERO

Consejero Principal de Tesis

Roberto Eduardo Lecuona

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Córdoba)

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

Doctor en Zoología (Universidad Pierre et Maire Curie – Paris VI, Francia)

Consejero

Alberto Blas Livore

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Master of Science, Mejoramiento Vegetal (Texas A & M University)

Doctor of Philosophy, Mejoramiento (Texas A & M University)

Consejero

Néstor Urretabizkaya

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Lomas de Zamora)

Magister en Control de plagas y su impacto ambiental (Universidad Nacional de General San Martín)

JURADO DE TESIS

JURADO

Jorge Alberto Zavalla

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae en Recursos Naturales (Universidad de Buenos Aires)

Doctor Rerum Naturalis, Ecología Química (Friedrich – Schiller – Universität)

JURADO

Ana María Romero

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctor of Philosophy en Fitopatología (North Carolina State University)

JURADO

Nancy Greco

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

Doctora en Ciencias Naturales (Universidad Nacional de La Plata).

Fecha de defensa de la tesis: 19 de Mayo de 2017

DEDICATORIA

A mis padres	Bel María Angélica y Rampoldi Raúl José. A ustedes dedicarle este logro y todo este camino recorrido para llegar hasta aquí, su dedicación, valores, educación y confianza en mi permitieron que hoy esto sea posible.
A mis hermanos	María José y Agustín, quienes siempre están presentes y desde el primer día me brindaron todo su apoyo.
A mi pareja	Lucrecia, por el apoyo incondicional durante este tramo final de mi tesis, por tu compañerismo y por el amor, quien me hace muy feliz.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, esta fascinante profesión y por haber aportado a que todo esto sea realidad.

A mis amigos de la facultad, brigada de aeromodelismo y barra de encuentros; quienes fueron parte de este proyecto en gran medida.

Agradecer en particular a mis colegas y amigos Néstor Urretabizkaya y Eduardo Romani, ya que siempre estuvieron para dar el apoyo necesario en cada etapa de este trabajo, intercambiando ideas y logrando que esto sea realidad.

Al grupo integrante de investigación del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (LHE) del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) de INTA Castelar, en especial a Posadas Julieta, Mini Ignacio y Nussenbaum Ana L., gracias por recibirme, por brindarme todo su apoyo y conocimiento como también su confianza y dedicación para mi formación profesional.

A mi director de tesis Lecuona Roberto, por su confianza, apoyo y acompañamiento en todo este proceso de formación profesional, por brindarme la posibilidad de ser parte de su equipo durante este trabajo.

A mis co-directores Livore Alberto B. y Urretabizkaya Néstor por el apoyo y trabajo conjunto durante todo este proceso, brindando conocimiento y dedicación profesional.

Al grupo de trabajo del Área de Arroz de la EEA INTA Concepción del Uruguay, por todo su apoyo, compañerismo y confianza.

A la Fundación ProArroz, por haber financiado parte de este trabajo, por bríndame la confianza y acompañe brindando los contactos con productores del sector arroceros.

A los colegas de las Cátedras de Zoología Agrícola y Terapéutica Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Concepción del Uruguay, quienes brindaron todo su apoyo para que dedicara tiempo y esfuerzo en este proceso de formación profesional.

Un especial agradecimiento a un gran amigo y colega Kruger Raúl Daniel, con quien compartimos grandes momentos de trabajo y estudio, durante el transcurso de este trabajo, permitiendo que esto sea posible.

DECLARACIÓN

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

Rampoldi, Andrés

DNI: 32.224.929

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Rampoldi, A.; Kruger, D.; Posadas, J.; Nussenbaum, A. L.; Lecuona, E. R. 2012. Aislamiento de cepas nativas de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* a partir de cadáveres de *Oebalus poecilus*.

Rampoldi, A.; Kruger, D.; Posadas, J.; Nussenbaum, A. L.; Lecuona, E. R. 2012. Screening de cepas de los Hongos Entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, para el control Microbiano de *Oebalus poecilus*. XIV Jornada Fitosanitaria Argentina, 2012, Potrero de los Funes, San Luis. Resúmenes Protección Vegetal, pp. 96.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
DECLARACIÓN	III
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
CAPÍTULO 1	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.2 REVISION DE LA LITERATURA	4
1.2.1 Generalidades de la chinche de la panoja del arroz	4
1.2.2 Taxonomía de <i>O. poecilus</i>	6
1.2.3 Ciclo biológico y descripción morfológica de <i>Oebalus poecilus</i>	6
Huevo	8
Ninfa	9
Ninfas 1° estadio:	9
Ninfas 2° estadio:	9
Ninfas 3° estadio:	10
Ninfas 4° estadio:	10
Ninfas 5° estadio:	10
Adulto:	11
1.2.4 Biología y hábitos de <i>O. poecilus</i>	12
1.2.5 Daño producido por <i>O. poecilus</i> en el cultivo de arroz	13
1.2.6 Metodos de control de <i>O. poeculis</i>	15
Control Químico	15
Control Biológico	16
Control microbiano	17
1.2.7 Generalidades de los hongos entomopatógenos	18
1.2.8 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.	19
Adhesión	19
Germinación	20
Penetración	20
Multiplicación del Hongo en el hemocele	21
Producción de Toxinas	22

Muerte del insecto	22
Colonización total	23
Emergencia del hongo hacia el exterior	23
Esporulación	23
1.2.9 Efectos subletales de hongos entomopatógenos	24
1.2.10 Factores que intervienen en el desarrollo de los hongos entomopatógenos	25
1.2.11 Propiedades de los hongos entomopatógenos	27
1.2.12 Beauveria bassiana (Bálsamo - Crivelli) Vuillemin 1912	27
1.2.13 Metarhizium anisopliae (Metschnikoff, 1879) Sorokin	29
1.3 OBJETIVOS	31
1.3.1 General	31
1.3.2 Específicos	31
1.4 HIPÓTESIS	31
CAPÍTULO 2	32
<i>Monitoreo de sitios de hibernación, recolección y aislamiento de material</i>	32
2.1 INTRODUCCIÓN	32
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.2.1 Recolección de material experimental	33
2.2.2 Cría y mantenimiento de <i>O. poecilus</i> en laboratorio	34
2.2.3 Aislamiento de hongos entomopatógenos nativos sobre cadáveres de <i>O. poecilus</i>	36
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
2.3.1 Recolección de material experimental	37
2.2.2 Cría y mantenimiento de <i>O. poecilus</i> en laboratorio	40
2.2.3 Aislamiento de hongos entomopatógenos nativos sobre cadáveres de <i>O. poecilus</i>	41
CAPÍTULO 3	44
<i>Bioensayos para seleccionar aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de <i>O. poecilus</i></i>	44
3.1 INTRODUCCIÓN	44
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.2.1 Bioensayos	46
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.3.1 Bioensayos	52
3.3.1.1 Ensayos de patogenicidad sobre adultos de <i>O. poecilus</i>	52
CAPÍTULO 4	62
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	62
4.2 CONCLUSIONES	65
4.3 NUEVAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN	66
BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Producción de arroz en la República Argentina para la campaña agrícola 2014/15. Provincias productoras, superficie cosechada, rendimientos promedios y participación en la producción total.	2
Tabla 2: Resultados del muestreo y recolección de <i>Oebalus poecilus</i> durante el año 2011 en Entre Ríos y sur de Corrientes.....	38
Tabla 3: Aislamientos de hongos entomopatógenos nativos encontrados en cadáveres de adultos de <i>Oebalus poecilus</i>	41
Tabla 4: Nomenclatura y origen de los aislamientos evaluados sobre adultos de <i>Oebalus poecilus</i>	46
Tabla 5: Productos fitosanitarios utilizados comúnmente en el cultivo de arroz y evaluados en bioensayo de compatibilidad sobre <i>Beauveria bassiana</i>	48
Tabla 6: Condiciones meteorológicas durante el ensayo a campo de control de cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre adultos de <i>Oebalus poecilus</i>	51
Tabla 7: Cuadro resumen de los modelos utilizados y valores de Vida Media (ST_{50}) de las cepas que superaron el 50% del control en el screening sobre <i>Oebalus poecilus</i>	55
Tabla 8: Recuentos de UFC por mililitro de la cepa Bb301 de <i>Beauveria bassiana</i> en mezcla con productos fitosanitarios usados comúnmente en cultivo de arroz en Entre Ríos	57
Tabla 9: Valores de control de las diferentes cepas evaluadas sobre adultos de <i>Oebalus poecilus</i> en ensayo a campo año 2013.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: a) Aparato bucal característico de un artrópodo hemíptero-heterópteros. b) Esquema de conducto bi-perforado del aparato bucal. (ant: antena; oc: ocelo; buc: bucula; lbm: labium; lbr: labro; sty: estilite; mx: maxila; md: mandíbula; fc: conducto alimenticio; sc: conducto salival). Adaptado de Triplehorn y Johnson (2005).	7
Fig. 2: Ala del primer par (hemiélitro) en insectos Heteroptera. Adaptado de Schwertner y Grazia (2007).	7
Fig. 3: Imagen de posturas de huevos de <i>Oebalus poecilus</i> ; a) huevos verdes y amarillentos, b) huevos anaranjados y rojizos.	8
Fig. 4: Imagen de agrupamiento de hembras de <i>Oebalus poecilus</i> y huevos recién colocados de postura en masa.	9
Fig. 5: Estados ninfales de <i>Oebalus poecilus</i> ; a-1) primer estadio, a-2) segundo estadio, a-3) tercer estadio, a-4) cuarto estadio y a-5) quinto estadio. Adaptado de Greve et al., (2003); b) imagen de huevos, ninfas 1 a 3 en una oviposición en masa.	11
Fig. 6: Adultos de <i>Oebalus poecilus</i> ; a) Macho, b) Hembra.	12
Fig. 7: Espiguillas de arroz manchadas y vacías (derecha), manchadas y atrofiadas (centro) y grano normal (izquierda), producidas por <i>Oebalus poecilus</i> . Adaptado: Ferreira et al., (2001).	15
Fig. 8: a) Colonia monospórica de <i>Beauveria bassiana</i> crecida sobre una placa de Petri con medio de cultivo agarizado (AMC); b) Estructuras de fructificación de <i>Beauveria bassiana</i> bajo microscopio óptico, teñidas con azul de algodón en lactofenol de Ammann 0,5% p/ v (400X); c) Estructuras de fructificación de <i>Beauveria bassiana</i>	29
Fig. 9: Estructuras de fructificación de <i>Metarhizium anisopliae</i> bajo microscopio óptico, teñidas con azul de algodón en lactofenol de Ammann 0,5 % p/v (400 X). Imagen Posadas y Lecuona, 2009.	30
Fig. 10: Ubicación de zonas de recolección de chinches.	33
Fig. 11: a) Método de red entomológica de arrastre para la búsqueda de <i>Oebalus poecilus</i> en sitios de hibernación. b) Insectos capturados y observación visual en matas de gramíneas.	34
Fig. 12: Sitios de muestreo en lotes arroceros y zonas aledañas.	34
Fig. 13: Imagen de la jaula de cría utilizada para los insectos recién recolectados.	35
Fig. 14: Ninfas de <i>Oebalus poecilus</i> en cría, con diferentes fuentes de alimentación. a) Plantas de arroz, b) Semillas de capín humedecidas, c) Solución azucarada.	36
Fig. 15: Sector de campo natural en borde de arrocería con control de herbicida.	39
Fig. 16: Especies donde se obtuvieron los mayores recuentos de <i>Oebalus poecilus</i> . a) <i>Echinochloa</i> spp., b) <i>Sorghum halepense</i> , c) <i>Stypha brachychaeta</i> , d) <i>Chloris virgata</i> ...	39
Fig. 17: Adultos de <i>Oebalus poecilus</i> hallados muertos en los monitoreos. a) Cadáver con <i>Beauveria bassiana</i> (Bb); b) Cadáver con <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Pl).	42
Fig. 18: Modelo de UE utilizado para desarrollar el ensayo, se observa el vaso, panojas y jaula de plástico con tul en la parte superior, colocadas sobre bandeja provista de agua para mantener la humedad.	47
Fig. 19: Imagen del Shaker, proceso de agitado de los fitosanitarios y cepa de <i>Beauveria bassiana</i>	49
Fig. 20: Procedimiento por el cual se efectuaban las diluciones en tubos de Enlarmeyers y luego se siembra en placas con MC para evaluar el recuento de viabilidad de conidios.	50
Fig. 21: a) Esquema de jaula (UE), b) Disposición de UE en ensayo a campo de control de cepas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre adultos de <i>Oebalus poecilus</i>	51

Fig. 22: Valores de mortalidad de los diferentes aislamientos evaluados sobre adultos de <i>Oebalus poecilus</i> para la selección de la cepa promisorio. Barras verticales indican el Error Estandar.	52
Fig. 23: Supervivencia Acumulada para las cepas pre-seleccionadas sobre el control de adultos de <i>Oebalus poecilus</i>	55
Fig. 24: Porcentaje de mortalidad de <i>Oebalus poecilus</i> para las concentraciones de Bb301 evaluadas en el ensayo.....	57
Fig. 25: Resultados de mezcla de cepa Bb 301 con productos herbicidas utilizados en cultivo de arroz en Entre Ríos.....	58
Fig. 26: Resultados de mezcla de cepa Bb 301 con productos insecticidas utilizados en cultivo de arroz en Entre Ríos.....	59
Fig. 27: Imagen de Bb 301 luego de la incubación de adultos de <i>Oebalus poecilus</i> recolectados muertos del ensayo a campo en el año 2013.	61
Fig. 28: Secuencia de pasos seguidos para la recolección, cría de insectos y aislamiento e identificación de cepas nativas de Hongos Entomopatógenos.	63
Fig. 29: Esquema de Bioensayos realizados con chinches y selección de Hongo Entomopatógeno Bb301 como promisorio para el control de adultos de <i>Oebalus poecilus</i>	64

RESUMEN

Título: Control Microbiano de la “chinche de la panoja del arroz”: *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851), mediante el empleo de hongos entomopatógenos.

La chinche de la panoja, *Oebalus poecilus* Dallas, 1851 (Hemiptera: Pentatomidae), es una plaga que está distribuida en toda la región arroceras de la Argentina y Sud-América, pudiendo ocasionar pérdidas de hasta el 80% en el rendimiento. El control de esta plaga en la actualidad se realiza mediante control químico, utilizando productos comerciales de mediano y alto impacto ambiental, interviniendo insecticidas en su mayoría fosforados, piretroides y carbamatos que tienen una prolongada persistencia en el agua y un gran efecto perjudicial sobre la fauna acuática. En la actualidad existe una gran demanda de soluciones a estos inconvenientes, la cual motiva al desarrollo de técnicas de manejo y control de insectos, que permitan reducir el impacto ambiental. La utilización de insecticidas biológicos logra estos objetivos con buenos valores de control de insectos, lo cual los hace seguros y eficientes. En el presente trabajo se evalúa la patogenicidad de cepas de hongos entomopatógenos (HE) sobre *O. poecilus*, como herramienta de control en el plan de Manejo Integrado de Plagas (MIP), para reducir la presencia de la plaga en el cultivo de arroz. Se efectuaron monitoreos y búsqueda de insectos en zonas arroceras del Centro-Norte de la Provincia de Entre Ríos, de las cuales se aislaron cepas nativas de HE. Se determinó en laboratorio la patogenicidad y virulencia de varias cepas, luego se determinó la concentración letal media (CL₅₀) de la cepa Bb 301 del HE *Beauveria bassiana* (cepa seleccionada para los estudios). Se analizó la compatibilidad de la cepa Bb 301 con productos químicos comerciales, entre los herbicidas se estudiaron a: Glifosato, Imazapic+Imazetapir y Bispyribac Sodico y entre los insecticidas a: Dinotefuran, Thiametoxan+Lambdacialotrina, Imidacloprid+Beta-Cyflutrina; todos fueron determinados como compatibles para Bb 301.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*; impacto ambiental, MIP, compatibilidad, herbicidas, insecticidas.

ABSTRACT

Title: The Microbial control of "small rice stink bug": *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851), through the utilization of entomopathogenic fungi.

The small rice stink bug, *Oebalus poecilus* Dallas, 1851 (Hemiptera: Pentatomidae), is a pest distributed throughout Argentina's and South America's rice-growing region, which can cause yield losses of up to 80%. At present, the control of this pest is carried out by chemical control, using commercial products of medium and high environmental impact. The most commonly used insecticides are phosphorus, pyrethroids and carbamates, which have a prolonged persistence in water and a great detrimental effect on aquatic fauna. Currently, the high demand for solutions to these problems motivates the development of new techniques for insects' management and control, in order to reduce the environmental impact. The employment of biological insecticides accomplish this aim, with good values of insects control, what makes them safe and efficient. This thesis evaluates the pathogenicity of different strains of entomopathogenic fungi (HE) on *O. poecilus* as a tool in an Integrated Pest Management (IPM) plan to reduce the presence of the pest in rice. Insects were collected in rice growing areas from North-Centre of Entre Ríos, from where native strains of HE were isolated. The pathogenicity and virulence of several strains were determined in laboratory, together with the average lethal concentration (LC_{50}) of HE *Beauveria bassiana*'s Bb 301 strain (strain selected for the studies). Also, it was analyzed the compatibility between Bb 301 strain and chemical products, which include the following herbicides: Glyphosate, Imazapic + Imazethapyr and Sodium Bispyribac; and the following insecticides: Dinotefuran, Thiametoxan + Lambda-cyhalothrin, Imidacloprid + Beta-Cyfluthrin. It was determined that all are compatible with strain Bb 301.

Key words: *Beauveria bassiana*, environmental impact, IPM, compatibility, herbicides, insecticides.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cultivos alimenticios más importantes dado que constituye la base de la dieta de más de la mitad de la población mundial (FAO, 2004). Según un informe de FAO, la duplicación de la producción de arroz reduciría la proporción de hogares que se encuentran en situación de inseguridad alimentaria en un 38 % (Minten y Barrett, 2008) (FAO 2013).

En el mundo se cultivan 160,6 millones de ha de arroz, con una producción de 738 millones de Tn (490,5 millones de Tn de arroz elaborado) y un rendimiento medio de 4,6 Tn/ha (FAO 2016), siendo su distribución muy amplia. Se cultiva en todos los continentes, excepto en la Antártida (Mackill y Lei, 1997), a partir de 53° N y hasta 40° S (Lu y Chang, 1980, Fujino y Sekiguchi, 2011).

En América del Sur se siembran cerca de 4,9 millones de ha de arroz. Brasil cuenta con 2,29 millones de ha destinadas a este cultivo, siendo el país de mayor peso en la producción sud-americana. Colombia es el segundo en orden decreciente con un total de 470 mil ha, Perú con 380 mil ha y le sigue Argentina con un total de 228 mil ha de arroz (FAO, 2015; MAGyP, 2015).

En Argentina la producción de arroz ronda los 1,6 millones de Tn, la misma está concentrada en la región del litoral, principalmente en las provincias de Entre Ríos y Corrientes, que representan, respectivamente, 38% y 43% de la producción total; el 19% restante se reparte entre Santa Fe, Formosa y Chaco (Tabla 1).

Tabla 1: Producción de arroz en la República Argentina para la campaña agrícola 2014/15. Provincias productoras, superficie cosechada, rendimientos promedios y participación en la producción total.

<i>Provincia</i>	<i>Superficie cosechada (ha)</i>	<i>Producción (Tn)</i>	<i>Rendimiento (Tn/ha)</i>	<i>Porcentaje de participación</i>
Chaco	5.900	29,50	5	2
Corrientes	97.022	659,75	6,8	43
Entre Ríos	74.200	578,76	7,8	38
Formosa	7.954	46,13	5,8	3
Santa Fe	43.300	207,84	4,8	14
Total	228.376	1.522		100

Fuente: ACPA 2015

Durante el desarrollo del cultivo, se pueden encontrar agentes biológicos que deprimen el potencial de rendimiento, en este caso la chinche de la panoja, *Oebalus poecilus* Dallas, 1851 (Heteroptera: Pentatomidae) es una de las plagas más importante. Esta chinche forma parte del complejo de chinches del cultivo de arroz, comparte su presencia con *Tibraca limbativentris* Stal. 1860 (Hemiptera: Pentatomidae), la que presenta menor frecuencia y densidad en lotes arroceros de la provincia de Entre Ríos. Está distribuida en toda la región arroceros de la Argentina. Se alimenta de granos en desarrollo de varias especies de plantas, tanto silvestres como cultivadas (Albuquerque, 1991), y es una plaga importante en el arroz bajo riego (Gallo et al., 2002). Este insecto se distribuye en todo el continente Americano, con sucesos notificados en Brasil desde 1918 (Ferreira et al., 2001).

En arroz ataca la panoja, alimentándose de los raquis, espiguillas y granos, lo que resulta en una reducción del peso del grano y de su poder germinativo, además del valor comercial (Ferreira y Barrigossi, 2006). Presenta un comportamiento particular sobre el cultivo en horas de mucho calor y alta radiación ubicándose en la base de la planta y recién en horas más frescas migran hacia las panojas, donde se encuentran alimentándose. La gran densidad de material verde presente en el cultivo al momento de floración-llenado de granos interfiere en la eficiencia del control químico realizado sobre esta plaga, haciendo en muchos casos complicado controlar este insecto. El control químico es generalmente considerado ineficaz, debido a que *O. poecilus* se mueve continuamente dentro y entre campos de arroz (Albuquerque, 1993). La naturaleza y extensión del daño depende del estado de desarrollo de los granos y de la densidad de la infestación (Ferreira y Barrigossi, 2006). Por otra parte, esta plaga es un vector de hongos fitopatógenos, que junto con su actividad de alimentación, contribuye

a una mayor incidencia de manchas en las espiguillas (Kennard, 1966; Antonioli, 1988; Vieira et al., 1999).

En la actualidad, la necesidad de lograr una óptima sanidad vegetal y la existencia de gran cantidad de plaguicidas sintéticos con buenos resultados en el control de plagas, ha hecho que los productores recurran a prácticas fitosanitarias que, en gran medida, se basan en su uso intensivo (Viggiani, 1990). Los plaguicidas y otros productos agroquímicos han sido usados cada vez con mayor frecuencia debido a sus beneficios en el control de artrópodos plagas, fitopatógenos y malezas pero estas sustancias constituyen una fuente importante de contaminación de los sistemas “no-blanco” debido a su uso excesivo y técnicas de aplicación no adecuadas (Pereira et al., 2009).

Es indudable que estos agroquímicos prestaron en un comienzo grandes beneficios a la humanidad y que aún los siguen prestando, pero también han originado nuevos e importantes problemas. Se debe asumir que hoy en día, insistir en el uso de plaguicidas en la forma profusa en que por lo general se los emplea, representa un peligro que no se había previsto ni valorado en su cabal magnitud (Viggiani, 1990). El desarrollo de resistencia a los insecticidas y las preocupaciones sobre los efectos deletéreos de los productos químicos en la seguridad ambiental y humana han proporcionado un fuerte impulso para el desarrollo de agentes de control microbiano en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Chi, 2005). Por otro lado, la implementación de los programas de MIP contribuyen a reducir el uso de plaguicidas peligrosos así como favorecer el uso simultáneo de agentes de control biológico y compuestos químicos compatibles para el control de la plaga (Golshan et. al., 2013).

El MIP es un sistema de control que tiende a seleccionar, integrar y aplicar en forma armónica, después de haber previsto las consecuencias ecológicas, económicas y sociales de esa aplicación, todos aquellos métodos apropiados para una situación determinada, con el objeto final de reducir las poblaciones, a niveles por debajo de aquel en el que causarían daño económico (Clavijo, 1992).

Entre los agentes biológicos que se pueden utilizar asociados a estos productos químicos en el control de plagas están los hongos entomopatógenos (Hull y Beers, 1985). Ellos tienen la particularidad de parasitar diferentes tipos de artrópodos (insectos y ácaros) y de encontrarse en los hábitats más variados (Lecuona et al., 1996). Estos microorganismos son de gran importancia dentro de los agroecosistemas por su capacidad natural para regular las poblaciones de artrópodos, la cual depende de la

Rampoldi, Andrés

susceptibilidad del hospedero o de la asociación patógeno-hospedero (Díaz et al., 2006). Tienen un considerable potencial para la supresión eficaz de una gran variedad de plagas de artrópodos, como por ejemplo: *Spodoptera frugiperda*, *Epilachna varivestis* (García y González, 2010); *Antonomus grandis* (Nussenbaum 2014) y *Tibraca limbativentris* (Kruger 2014). Se conoce la ocurrencia natural de enfermedades sobre los insectos de diferentes órdenes, siendo los hongos *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, los entomopatógenos más ampliamente utilizados en el manejo de insectos plagas de importancia en la agricultura (Lecuona, 1996). *Beauveria bassiana* es uno de los hongos entomopatógenos más importantes (Liu et al., 2002; Al-Maza et al., 2006). Por otro lado, el uso de hongos entomopatógenos (HE) aparece como una posible alternativa eficaz y segura (Moino Jr. 2000) dentro de una estrategia de MIP.

Es importante mencionar que en nuestro país no existen reportes de control de *O. poecilus* con HE, como tampoco datos de aislamientos nativos de HE sobre esta chinche. Por lo descrito anteriormente, este trabajo contempla el desarrollo del control microbiano de *Oebalus poecilus* por medio de HE, pretendiendo aportar técnicas y manejos de estos biocontroladores para el desarrollo del MIP en el cultivo de arroz.

1.2 REVISION DE LA LITERATURA

1.2.1 Generalidades de la chinche de la panoja del arroz

La presencia de *O. poecilus* en el cultivo se ha incrementado con el correr de los años, viéndose favorecida por las rotaciones más cortas, repetidas campañas de arroz sobre los mismos lotes, rotaciones con siembra directa de soja y arroz, lo que llevó a mantener rastrojo y cobertura de malezas sobre los lotes, que sirven de refugio para dicha plaga. En Entre Ríos, la producción de arroz se concentra en el centro-norte de la Provincia, siendo su aptitud agrícola casi exclusiva para cultivos como soja-arroz, lo cual magnifica aún más la problemática de rotaciones cortas y su efecto sobre el aumento poblacional de esta especie. La topografía y flora presentes en la zona en la que predominan los montes ribereños que bordean los lotes arroceros y la existencia de zonas de represas o embalses para el riego del cultivo, generan sitios propicios para el desarrollo de grandes poblaciones de chinches, las cuales ingresan al cultivo en el momento de floración. La naturaleza y extensión del daño depende del estado de desarrollo de los granos y de la densidad de la infestación (Ferreira y Barrigossi, 2006).

1.2.2 Taxonomía de *O. poecilus*

Se describe a continuación su taxonomía:

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Familia: Pentatomidae

Especie: *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851).

Nombres comunes:

En Argentina: Chinche de los granos, Chinche chica del arroz (Rizzo, 1976).

En Uruguay: Chinche pequeña de las espigas, (Bentancourt y Scatoni 2010).

En Brasil: percevejo do arroz (Amaral, 1949; Rossetto et al., 1972; Albuquerque, 1993), percevejo do grão (Ferreira y Martins, 1984)

En Perú: chinches hediondas de la espiga (Vecco y Jiménez, 2004).

1.2.3 Ciclo biológico y descripción morfológica de *Oebalus poecilus*

Oebalus poecilus es un insecto polifitófago, alimentándose en gran parte de especies poáceas. Presenta una metamorfosis incompleta o heterometabolía pasando por los estados de desarrollo de Huevo-Ninfa-Adulto y son paurometábolos donde los estados Ninfa-Adulto comparten el hábitat y régimen alimenticio. Esta especie presenta un hábito gregario, el cual se magnifica al momento de efectuar las posturas de huevos, generando grandes masas de miles de huevos en pocos metros cuadrados. El aparato bucal es tipo picador succionador en forma de estilete de cuatro segmentos, formado en la parte externa por dos mandíbulas con ápices dentados, y en el interior formado por dos maxilas de extremos simples (Fig 1-a). Las maxilas tienen dos excavaciones o ranuras longitudinales en las caras internas que se tocan, formando dos canales paralelos, un canal superior a través del cual el alimento líquido es succionado hasta la faringe, y uno inferior por donde fluye la saliva (Fig. 1-b). Las chinches tienen patas ambulatorias, las alas delanteras o 1° par son del tipo hemiélitro (Fig. 2) y posterior o 2° par del tipo membranoso (Costa Lima, 1940).

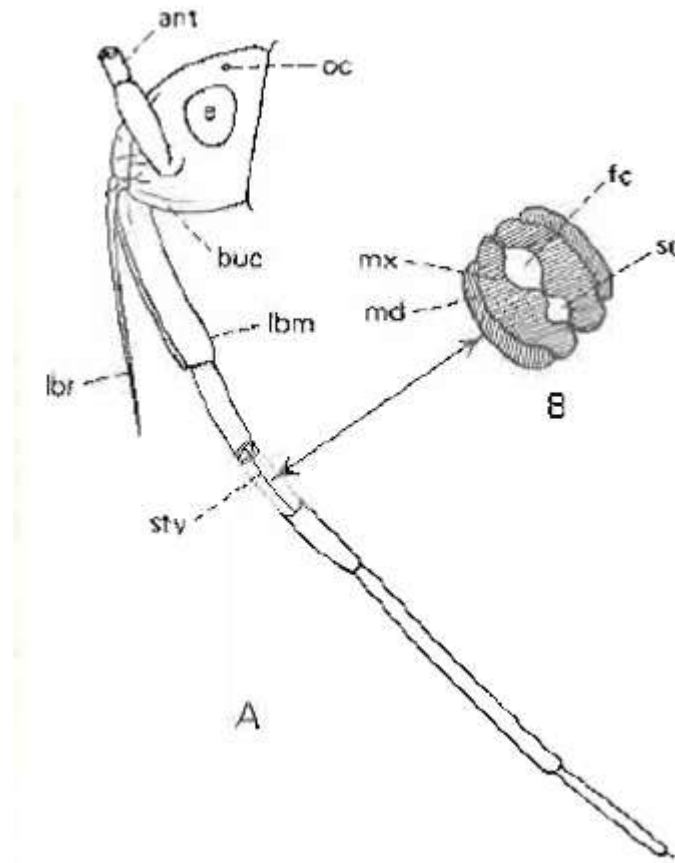


Fig. 1: a) Aparato bucal característico de un artrópodo hemíptero-heterópteros. **b)** Esquema de conducto bi-perforado del aparato bucal. (**ant**: antena; **oc**: ocelo; **buc**: bucula; **lbm**: labium; **lbr**: labro; **sty**: estilete; **mx**: maxila; **md**: mandibula; **fc**: conducto alimenticio; **sc**: conducto salival). Adaptado de Triplehorn y Johnson (2005).



Fig. 2: Ala del primer par (hemiélitro) en insectos Heteroptera. Adaptado de Schwertner y Grazia (2007).

Huevo

La duración de la etapa de huevo es variable con una media entre 5 a 14 días dependiendo de la temperatura (Rossetto et al., 1972; Amaral 1949). Son inicialmente de color verde claro (Fig. 3-a), forma cilíndrica, ligeramente redondeadas en la base, de una altura y diámetro de 0,7 y 0,5 mm respectivamente (Amaral, 1949). Veinticuatro horas después de la oviposición, los huevos se vuelven amarillentos con dos ranuras longitudinales rojizas (Fig. 3-b). Posteriormente, con el avance de los días de incubación se convierten en rojo-amarillo con dos manchas rojas laterales e inclinadas en la periferia, que se elevan desde la base hasta el polo superior y finalizan próximos a la eclosión de las ninfas en un color rojo intenso. El huevo infértil no sufre cambio de color, y queda de color verde brillante o verde-amarillo (Squire, 1934; Costa Lima, 1940; Amaral, 1949). Las posturas se colocan en filas de a dos, escalonadas de forma que cada huevo queda tocando a otros dos. Generalmente se encuentran en las hojas, y cuando la población es grande también se colocan en los tallos y panículas (Ferreira y Martins 1984, Vieira et al. 1999). Zucchi et al. (1993) mencionaron una postura de 300 huevos por hembra, en tanto que Halteren (1972) reportó posturas de 200 huevos por hembra (Figura 4).



Fig. 3: Imagen de posturas de huevos de *Oebalus poecilus*; **a)** huevos verdes y amarillentos, **b)** huevos anaranjados y rojizos.



Fig. 4: Imagen de agrupamiento de hembras de *Oebalus poecilus* y huevos recién colocados de postura en masa.

Ninfa

Presenta 5 estadios ninfales (Figura 5-a,b), los cuales varían en el tiempo de muda según las condiciones ambientales de temperatura. En una temperatura media de 23,1 °C, la duración promedio es de 40,6 días (Amaral, 1949). Kishino (1993) observó períodos de ninfa promedio de 30,7 y 19,7 días para el 25 y 30 °C, respectivamente; por otro lado, a 20 °C las ninfas no se desarrollaron. Vecchio et al. (1994) indicó que *O. poecilus* está entre las cuatro especies de Pentatomidae que tienen dimorfismo estacional determinado por fotoperiodo. Albuquerque (1989-1993), describió que en esta especie la etapa fotosensible es la de ninfa, más precisamente los primeros tres estadios; ninfas expuestas a fotoperiodos largos ($\geq$ a 13:50 horas de luz) dan lugar a la forma de vida sexual activa, llamada forma no-hibernante; mientras que las ninfas expuestas al fotoperiodo corto ($\leq$ a 13:00 horas de luz) dan lugar a una forma sexualmente inactivos y permanecen en diapausa durante el invierno, llamada forma hibernante.

Ninfas 1° estadio:

Al eclosionar son de color rojo claro, y después de unas horas se oscurecen. El cuerpo es de forma ovalada con la cabeza y tórax negro-brillante. Ojos rojo oscuro, ocelos ausentes (Greve et al., 2003). Las antenas son de color marrón oscuro, casi negro, con bandas más claras sobre los puntos de conexión. El abdomen es de color rojo cereza, con tres puntos negros alargados, claramente visibles. El color de las patas varía de marrón oscuro a negro. El tamaño es de 1,1 mm de largo y 0,8 mm de ancho (Ferreira et al., 2001). Este estadio dura aproximadamente 2,8 días (Greve et. al., 2003).

Ninfas 2° estadio:

Presentan una coloración negra, resultante del desarrollo de las manchas dorsales del abdomen. Las tres manchas abdominales longitudinales aumentan de tamaño y esto ayuda a tornar el color más oscuro. Su tamaño es de 1,7 mm de largo y 1 mm de ancho (Ferreira et al., 2001). El estadio dura 4,2 días aproximadamente (Greve et. al., 2003).

Ninfas 3° estadio:

En el tercer estadio, hay una ligera modificación del margen lateral del tórax que se presenta transparente, y el color del abdomen que varía del rojo al naranja moteado de color blanco. Su tamaño varía de 2,6 mm de largo y 1,6 mm de ancho (Ferreira et al., 2001). La duración del estadio es de 4,5 días (Greve et. al., 2003).

Ninfas 4° estadio:

En el cuarto estado la coloración es variable. Algunas ninfas mantienen las características de las etapas anteriores. Cabeza y tórax de color negro brillante, con antenas de color marrón oscuro y bandas claras en los puntos de conexión y las patas de color negro brillante; abdomen rojo o naranja con pintas blancas. Mientras que otras presentan la cabeza de color amarillo y contorno frontal negro con dos manchas oscuras en la zona frontal y dos rayas negras longitudinales y paralelas, llegando a la mitad de la cabeza. Tórax verde con pintas oscuras, más oscuro en la parte central, abdomen verde claro salpicado de blanco. Los tres puntos negros claramente visibles observados en los estados anteriores, se presentan con el centro blanco y bandas rojas intercaladas. Las patas son de color amarillo salpicado de puntos negros y blancos. Ocelos presentes de color rojizo (Greve et al., 2003). Su tamaño varía de 3,4 mm de largo y 2,2 mm de ancho (Ferreira et al., 2001). La duración del estadio de 7,3 días (Greve et al., 2003).

Ninfas 5° estadio:

Este estado se caracteriza porque el insecto presenta los esbozos alares en su máximo desarrollo, el cual determina la última muda juvenil. Su tamaño varia de 5,6 mm de largo y 3,4 mm de ancho (Ferreira et al., 2001). También al igual que el 4° estadio, presentan diferentes coloraciones, pueden presentar antenas, cabeza, tórax y esbozos alares negros, abdomen rojizo con puntos blancos con las tres manchas dorsales negras; o con cabeza, tórax y esbozos alares amarillentos con los tres segmentos basales de las antenas claros, salpicados de negro y los dos apicales de color castaño-oscuro o negros. La duración del estadio es de 11,3 días (Greve et. al., 2003).

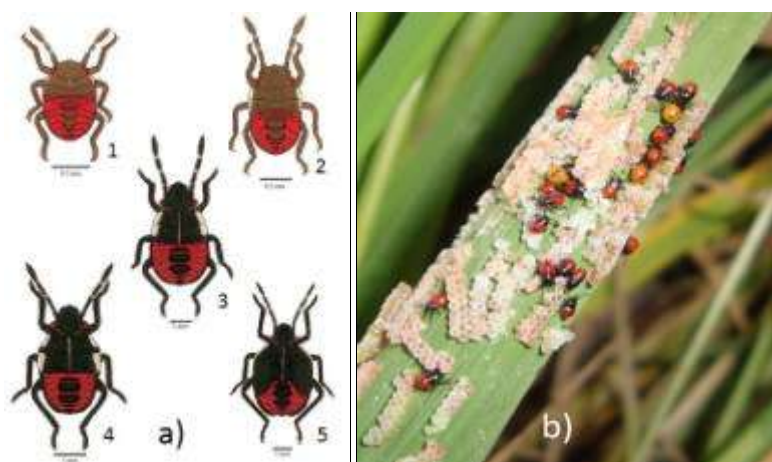


Fig. 5: Estados ninfales de *Oebalus poecilus*; **a-1)** primer estadio, **a-2)** segundo estadio, **a-3)** tercer estadio, **a-4)** cuarto estadio y **a-5)** quinto estadio. Adaptado de Greve et al., (2003); **b)** imagen de huevos, ninfas 1 a 3 en una oviposición en masa.

Adulto:

El tamaño de este insecto en estado adulto varía de 8,1 a 8,9 mm de largo por 4 a 4,2 mm de ancho (Chaves et. al., 2001). La coloración varía de marrón claro a marrón oscuro, presentando manchas amarillas características en el pronoto, escutelo y hemiélitros; y se caracteriza por liberar un olor desagradable al ser capturado o molestado (Pugliese, 1955; Amaral, 1949). Los adultos tienen una glándula odorífera situada en el metatórax con dos canales excretores terminando cada uno en un orificio (ostíolo) claramente visible al lado de las coxas traseras (Squire, 1934; Costa Lima, 1940). La relación de sexo macho: hembra en los adultos es de 50,9: 48,9 (Amaral, 1949). Según Amaral (1949), el tiempo necesario para iniciar una nueva generación se puede obtener mediante la suma de 16,1 días para llegar a madurez sexual, 11,2 días para el período de pre-oviposición, 9,5 días para la incubación de los huevos y 40,2 días para el período de ninfa, dando un total de 77,0 días.

Macho: Según Ferreira et al., (2001); presentan forma ovalada o en escudo, tamaño de 8,1 mm de largo y 4,1 mm de anchura; dorsalmente el color varía de marrón claro a oscuro; antenas de color marrón o marrón claro; presenta dos manchas amarillentas, largas, curvas, separadas en el centro y dirigido hacia fuera del pronoto, las cuales pueden no estar presentes; las expansiones laterales “espinas” del protórax son de menor tamaño que en las hembras; el escutelo presenta en el ápice una mancha amarilla, en cada extremo distal del hemiélitro hay un punto rectangular amarillo (Figura 6-a); en la zona ventral, el tórax puede ser de color marrón oscuro o claro, el abdomen de color

marrón claro, con una franja longitudinal media más oscuro, las patas son de color marrón claro.

Hembra: Según Ferreira et al., (2001), presentan forma del cuerpo ovalada, más grande que el macho, midiendo 8,9 mm de largo y 4,2 mm de ancho; la coloración dorsal y de antenas similar al macho; las manchas del pronoto amarillas, redondeadas hacia afuera están bien visibles; las expansiones laterales del pronoto bien puntiagudas y hacia atrás en mayor medida que en el macho, en forma de espinas; escutelo con manchas iguales a las descritas para el macho; patas castaño amarillento con puntos negros, los cuales pueden no estar presentes; ventralmente color oscuro con las región de las coxas más claras; región abdominal castaño claro, con faja media longitudinal y dos laterales más oscuras (Figura 6-b).



Fig. 6: Adultos de *Oebalus poecilus*; **a)** Macho, **b)** Hembra

1.2.4 Biología y hábitos de *O. poecilus*

Esta chinche pasa el invierno en estado adulto, el cual es en su mayoría sexualmente inmaduro, se refugia en las partes más bajas de la hierba, debajo de las hojas, en grietas del suelo; y luego emergen a mediados de la primavera, cuando se mueve a los hospedantes naturales, donde se alimentan principalmente de semillas en formación (Amaral 1949). De acuerdo con Pugliese (1955), entre los hospedantes naturales de este insecto se cuentan: *Digitaria horizontalis* (Willd), *Polygonum persicaria* (L.), *Panicum plantagineum* (LK), *Paspalum furcatum* (F1), *Solanum sisymbriifolium* (Lam.), *Solanum spp.* y *Echinochloa crus -galli* (L.). En un cultivo infestado es en el capín (*Echinochloa crus -galli* L.) donde las chinches suelen hacer el primer acercamiento ya que florece primero que el arroz, y en el cual la alimentación de este insecto en esta planta es de suma importancia para su desarrollo; asimismo, al ser

vegetación alta y densa le sirve de refugio en los días de calor excesivo (Pugliese, 1955; Ferreira y Martins, 1984).

O. poecilus se caracteriza por presentar diapausa sexual, es decir pasa el invierno en forma de adulto inmaduro sexualmente. Albuquerque (1993) caracterizó las dos formas, hibernante y no hibernante del adulto de *O. poecilus*, la primera presenta una coloración dorsal predominante marrón claro, con las expansiones del pronoto redondeadas; mientras que la no hibernante presenta coloración dorsal más oscura, expansiones laterales del pronoto más agudas y bien formadas. El autor verifica que días cortos con fotofase de 13 hs y 18 min fueron suficientes para inducir la diapausa del insecto, siendo los más sensibles los estadios de ninfa iniciales.

Este comportamiento en invierno fue reportada por Santos et al., (2003) quienes describen el período de inactividad desde el mes de marzo hasta el mes de octubre cuando se inicia la actividad reproductiva. Estos resultados corroboran los de Amaral (1949), quien encontró en el laboratorio que estos insectos en estado adulto son inactivos durante el invierno, copulando sólo al final de octubre, y comenzando la actividad reproductiva en la 1ª semana de noviembre.

En la primavera, cuando inicia su actividad luego del período de hibernación, necesita alimentarse para poder iniciar su ciclo reproductivo, estando relacionado este inicio con el almacenamiento de sustancias de reserva, como la grasa corporal, el cual ha sido señalado por Beck (1980) y Tauber et al., (1986). Al cultivo de arroz ingresan en etapas de floración, alimentándose en su mayoría de granos en formación. Se dispersan a lo largo del día, y se reúnen en la tarde; muchas de las hembras pueden elegir algunas plantas de arroz para poner sus huevos, este hábito gregario en etapas reproductivas caracteriza a esta especie, lo que lleva a encontrar grandes masas de posturas de huevos. Este insecto presenta un hábito particular dentro del cultivo durante el día evitando estar expuestos a altas temperaturas durante las horas cercanas al medio día, protegiéndose en el interior y zona basal del cultivo, próximo a la lámina de agua donde las temperaturas son menores y no quedan expuestos al sol.

1.2.5 Daño producido por *O. poecilus* en el cultivo de arroz

Los daños en el cultivo son causados durante todo su ciclo biológico, tanto la ninfa y el adulto pueden causar un gran daño en función de la densidad de población (Pugliese, 1955; Ferreira, 1998 a,b y 1999). Se destaca que los últimos estadios de ninfa

y el adulto son los que mayores tasas de consumos tienen, y por ende los que mayores pérdidas producen en el cultivo. El adulto y ninfa se alimentan en las espiguillas y raquis de panículas primarias y secundarias. El insecto utiliza sus largas piezas bucales para perforar y extraer los líquidos de espiguillas en desarrollo y raquis de las panojas. Es característico observar el sitio de alimentación en el grano (Chaves et. al., 2001) daño que se manifiesta como puntos oscuros sobre el grano, causado por la proliferación de microorganismos luego de la perforación producida por el estilete del artrópodo al momento de alimentarse.

El daño en las espiguillas de arroz al comienzo de la etapa lechosa genera una interrupción en la continuidad del desarrollo normal de la semilla, y como resultado ocasiona un grano chuzo o directamente no hay grano (Figura 7). Si el daño lo producen en etapa de grano pastoso, no se pierde por completo ese grano, pero se observa un manchado y estructuralmente queda debilitado (Chaves et. al., 2001). Los granos originados a partir de espiguillas atacadas tienen menos poder germinativo y por ende se reduce el valor comercial (Ferreira, 1998-a). Por afectar el valor cualitativo y cuantitativo de arroz, *O. poecilus* ha sido considerada como una de las principales plagas del cultivo. En los estudios realizados por Ferreira et al., (1999) en el cual evaluaron 10 genotipos de arroz, las pérdidas cualitativas fueron mayores que las pérdidas cuantitativas, además de actuar como vectores de hongos como *Helminthosporium oryzae*, *Nigrospora oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp. y *Penicillium* sp., causando manchas en las semillas las cuales generan depreciación comercial. Por otro lado, granos estructuralmente debilitados pueden romperse durante el proceso de pulido y de ese modo reducir el porcentaje de granos enteros de arroz lo cual reduce su valor comercial. Los granos que se manchan y no se rompen durante el proceso de pulido tienen manchas, se ven castigados en el precio comercial (Kennard, 1966; Antonioli, 1988). Martins et al., (1989) observaron que una chinche adulta puede dañar hasta 61,7 granos de arroz. Ferreira et al., (2001), reportan que esta especie causó una pérdida total de 52,7 % sobre 10 genotipos de arroz cultivado, siendo 29,9% daños cuantitativos y 33% daños cualitativos. Vecco y Jiménez (2004), en grano lechoso, registraron una disminución del rendimiento con respecto al testigo entre 17 y 36%, siendo el último valor correspondiente al nivel de 1 chinche/panoja; en grano ceroso, registraron una disminución del 5.5%; el umbral de daño económico (UDE) o umbral de acción (UA) para esta experiencia se localizó en 1 chinche/panoja y una pérdida del 36% del rendimiento hipotético. Por otra parte,

Rampoldi, Andrés

Ferreira y Barrigossi, (2006) reportan que el estado de grano lechoso y pastoso es el más crítico para el ataque de este insecto, produciendo pérdidas que pueden llegar al 80 %. Cada ninfa de tercer estadio y cada adulto, de permanecer 24 horas en panojas, pueden dañar un promedio de 2,6 espiguillas en la etapa lechosa, 1,5 espiguillas en la etapa de grano pastoso y 0,8 espiguillas en grano maduro (Ferreira et al., 2002).



Fig. 7: Espiguillas de arroz manchadas y vacías (derecha), manchadas y atrofiadas (centro) y grano normal (izquierda), producidas por *Oebalus poecilus*. Adaptado: Ferreira et al., (2001).

1.2.6 Metodos de control de *O. poeculis*

Control Químico

Este método es el más utilizado en la actualidad, los plaguicidas y otros productos agroquímicos han sido usados cada vez con mayor frecuencia debido a sus beneficios en el control de plagas (Pereira et al., 2009). Las técnicas de control se destinan básicamente a aplicaciones una vez alcanzado el UDE, no siendo oportunos o justificados los tratamientos preventivos. Según el reporte de EMBRAPA (2008) se debe iniciar el monitoreo de la plaga en el cultivo cuando aparecen las primeras panojas, es decir, inicio de floración. La toma de decisión de aplicar un insecticida se debe realizar cuando se alcanza el nivel de tratamiento o acción; para determinar este nivel de acción es necesario efectuar el monitoreo del cultivo, el cual se realiza por medio de una red entomológica de arrastre, con dimensiones de 0,38 m de diámetro del aro, profundidad de 0,80 m del saco (EMBRAPA 2008), este nivel se alcanza cuando se recolecta una media de 5 chinches en 10 golpes de red para las etapas iniciales de

formación de grano y 10 chinches en 10 pases de red cuando se encuentra en estado de grano pastoso-duro.

Bernhardt, (2009) reporta buenos resultados al evaluar el control con dinotefuran y clothiandin y de 7 a 10 días de residualidad. Esta actividad residual es lo que le falta a la mayoría de los piretroides y organofosforados actualmente registrados.

Es importante tener en cuenta que para esta especie en particular, los controles están fuertemente influenciados en el momento del día y condiciones ambientales en las que se realizan las aplicaciones. Se mencionó en el punto (1.2.4) su comportamiento temporal dentro del cultivo, es por ello que los controles no suelen ser en su totalidad exitosos. Por otra parte, el compuesto aplicado puede ser transportado desde el suelo hacia el aire, agua o vegetación, pudiendo entrar en contacto por inhalación o ingestión, con una amplia gama de organismos, incluyendo los seres humanos. Esto genera importantes efectos tanto ambientales como para la salud humana (RAPAL Uruguay 2010).

La contaminación de las diferentes matrices ambientales (por ejemplo, agua y suelo), a través de la dispersión del producto, la volatilización, la escorrentía y/o lixiviación, ha sido ampliamente reportado en la literatura (Cerejeira et. al., 2003; Wilson y Foos, 2006; Tariq et. al., 2007).

Control Biológico

El término “control biológico” fue usado por primera vez por H. S. Smith en 1919, para referirse al uso de enemigos naturales (introducidos o manipulados) para el control de insectos plaga (Rodríguez del Bosque y Arredondo Bernal, 2007). Su alcance se ha extendido con el tiempo, a tal grado que ahora se presentan problemas para definirlo adecuadamente, en particular porque el término implica aspectos académicos y aplicados (Wilson y Huffaker 1976; Garcia et al., 1988; Eilenberg et al., 2001). Por otro lado, se entiende como control biológico al “uso de organismos vivos como agentes para el control de plagas” (Greathead y Waage 1983).

El control biológico puede ser natural o aplicado. Según la descripción de Van Driesche y Bellows (1996), se denomina control biológico natural al que ocurre sin ninguna intervención del hombre, originado por biocontroladores que naturalmente existen y sucede de forma espontánea y ordinaria. Dentro del control biológico aplicado, podemos definir estos tres tipos:

-Clásico: consiste en la importación y colonización de parasitoides y predadores exóticos contra plagas primariamente exóticas, aunque en algunos casos también se los emplea contra plagas nativas.

-Aumentativo: consiste en la cría y liberación periódica de enemigos naturales en grandes cantidades (inundación) o la liberación de pocos individuos que sobrevivirán por varias generaciones subsecuentes (inoculación). A diferencia del anterior no necesariamente implica la importación de enemigos naturales ya que pueden ser nativos.

-Por conservación: consiste en el aumento de parasitoides y predadores ya presentes en el agroecosistema por manipulación de su ambiente, tornándolo de algún modo más favorable. Dentro de estas manipulaciones se incluye los cambios de fecha de siembra, métodos de cultivo, uso de plantas hospederas, uso selectivo de agroquímicos, y toda medida que tienda a favorecer estos bio-controladores.

O. poecilus presenta algunos biocontroladores naturales, por ejemplo los adultos son depredados por *Apiomerus flavipennis* (Hemiptera: Reduviidae); las ninfas y adultos están parasitadas por *Beskia cornuta* (Rossetto et al., 1973); *Beskia aelops*; *Gymnoclytia* sp., *Ormia* sp. (Becker et al., 1989) (Diptera: Tachinidae), y los huevos por *Telenomus mormidae* (Hymenoptera: Scelionidae) (Rossetto et al., 1973). Es importante destacar la acción de los tachinidos sobre *O. poecilus* en el campo, en tres fases de la actividad del insecto (en hibernación, en las plantas nativas u hospedantes y en plantas de arroz), demostrando que un mayor porcentaje de parasitismo ocurrió cuando el insecto estaba en plantas nativas o sitios de hibernación (Becker et al., 1989).

Control microbiano

En los últimos años, la cantidad de trabajos con el objetivo de evaluar y desarrollar el control de insectos plagas en cultivos extensivos e intensivos por medio de Hongo Entomopatógenos (HE) se ha incrementado notablemente. Estos microorganismos ocurren naturalmente en los agroecosistemas y son de gran importancia por su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos, la cual depende de la susceptibilidad del hospedero o de la asociación patógeno-hospedero. En este último caso, el insecto hospedero puede ejercer una presión de selección que favorezca a pocos genotipos del patógeno es decir que hay una selección natural de estos microorganismos en términos de especialización con respecto al hospedero (Maurer et al., 1997; St. Leger y Roberts, 1997).

Estos organismos han demostrado un potencial considerable para el control de insectos, especialmente cuando están incluidos en programas de MIP (Lacey y Goettel, 1995). Es por ello que la posibilidad de desarrollar el control de la chinche de la panoja del arroz por medio de estos microorganismos entomopatógenos es viable y factible de considerar.

1.2.7 Generalidades de los hongos entomopatógenos

Es conocido su potencial como agentes de control, al constituir un grupo de numerosas especies que pueden infectar insectos (Hajek y St. Leger, 1994; Roy et al., 2006; Díaz et. al., 2006). Ellos tienen la particularidad de parasitar diferentes tipos de artrópodos (insectos y ácaros) y de encontrarse en los hábitats más variados (Lecuona et al., 1996). Según Alves (1998), la alta patogenicidad de algunos microorganismos, la capacidad de multiplicación y dispersión en el ambiente, el carácter enzoótico y la no toxicidad sobre humanos son atributos favorables para formar parte de un conjunto de medidas que, trabajando en armonía con el medio ambiente, son capaces de reducir las poblaciones de insectos a niveles deseables que no causan daño. El carácter patogénico de los HE, además, involucra una serie de eventos fisiológicos que considerados en conjunto, permiten suponer que la aparición de resistencia en insectos susceptibles sea menos probable (Hegedus y Khachatourians, 1995). La susceptibilidad y la relación con los hospederos se relacionan con los nutrientes presentes en los insectos, que son el medio para la propagación, dispersión y persistencia de los hongos.

Las esporas o conidios de los HE tienen requerimientos específicos de humedad y temperatura, así como de otros factores ambientales que en conjunto funcionan como inductores para la activación de receptores presentes en el patógeno y que les permiten llevar a cabo el proceso infectivo sobre el hospedero (Hajek, 1997). Los HE, a diferencia de otros agentes entomopatógenos, no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo (Carruthers y Hural, 1990), pudiendo ocurrir la infección por contacto y adhesión de los conidios a las partes bucales, membranas inter-segmentales o a través de los espiráculos respiratorios (Charnley, 1997; Jeffs et al., 1997; Kershaw y Talbot, 1998).

Para seleccionar un HE con el fin de utilizarlo como bioinsecticida dentro de un programa de MIP, es importante identificar las características de virulencia contra el insecto plaga, además de conocer su variabilidad bioquímica, para así seleccionar el aislamiento con las mejores características (Hajek y St. Leger, 1994). Dentro de estos

agentes entomopatógenos, los HE de insectos más estudiados son los pertenecientes al orden de los Hypocreales que incluye a las familias Cordycipitaceae (*Beauveria*) y Clavicipitaceae (*Metarhizium*, *Isaria* (= *Paecilomyces*), *Hirsutella*, *Lecanicillium* (= *Verticillium*) y *Nomuraea*).

Los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* son especies de distribución cosmopolita e infectan a una gran diversidad de insectos (Tanada y Kaya, 1993). El suelo es el hábitat natural para estas especies de hongos (Hajek, 1997), y diversos estudios han demostrado diferencias en cuanto a la abundancia relativa presente en diversos suelos tanto de uso agrícola, como en suelos adyacentes a cultivos y en bosques (Vänninen, 1996; Bidochka et al., 1998; Keller et al., 2003). En los últimos años muchos productos biológicos de hongos *Metarhizium* y *Beauveria* son aplicados en todo el mundo para el control de plagas (Burges, 1998; Butt y Copping, 2000; Faria y Wraight, 2007).

1.2.8 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.

En el ciclo patogénico, el contacto entre el inóculo del entomopatógeno y el artrópodo es fundamental para el inicio del proceso infeccioso. La epicutícula o capa más externa del integumento del hospedante es el sitio inicial de la interacción patógeno-hospedante. Inician su proceso infectivo en los insectos hospederos cuando las esporas viables son retenidas por contacto en la superficie del tegumento, mientras encuentran un espacio propicio para establecer la asociación patógeno-hospedero (Jones, 1994) y formar los tubos germinales y a veces el apresorio, que facilitarán la invasión del hongo. (Hajek, 1997; Deshpande, 1999; Milner, 2000; Asaff et al., 2002; Barranco et al., 2002). En general en el proceso de la patogénesis (micosis), se observan 10 etapas (Lecuona et al., 1996):

Adhesión

Es un fenómeno que permite la fijación de los propágulos o unidades infectivas sobre la superficie del hospedante por medio de mecanismos donde intervienen propiedades físicas, químicas y electrostáticas del patógeno y el hospedante. Esta etapa consta de tres fases. La primera fase es la adsorción o inmovilización del microorganismo sobre la superficie, es una unión pasiva donde intervienen factores físicos y químicos del sustrato como fuerzas de Van der Waals y electrostáticas. En segundo lugar se da la fase de contacto donde la interacción entre el patógeno y el

Rampoldi, Andrés

hospedante está en función de la capacidad del propágulo de emitir microextensiones activas que refuercen las uniones electrostáticas entre ambas superficies. La tercera y última fase es la consolidación de esta interfase y se llama adhesión; ésta puede ser pasiva y no específica, sin requerimiento de energía; o activa y específica, necesitando de cofactores y de energía, iones, carbohidratos, lípidos, glucoproteínas, etc. Estas sustancias o secreciones mucilaginosas aparecen dentro de las primeras horas del contacto entre el hospedante y el patógeno, antes de la germinación de los propágulos. Este fenómeno puede estar relacionado con las modificaciones en la composición de hidrocarburos cuticulares producidas dentro de las primeras seis horas del contacto (Lecuona et al. 1991) o cambios a nivel conidial (Kunoh et al. 1988) como la producción de esterases, elastasas, lipasas y N-acetylglucosaminidasa durante la fase pregerminativa (Michel, 1981; St. Leger et al. 1986; 1987a,b; 1988b,c).

La adhesión es un paso importante en el proceso patogénico y ha sido correlacionado con la especificidad del patógeno por el hospedante (Lecuona et al., 1996).

Germinación

La germinación de los conidios se inicia con el hinchamiento del mismo (hidratación), que es favorecido por una humedad alta (70% durante 14h); la germinación es disparada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto (Hegedus y Khachatourians, 1995; Khachatourians, 1996). La hidratación del conidio es favorecida por la acción antidesecante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por sistema inmune del insecto; después del hinchamiento de la espora tiene lugar la formación del tubo germinativo mediante el proceso de polarización típico del crecimiento apical de los hongos, que estimula la síntesis de la pared celular (Díaz et al., 2006). El tubo germinativo rastrea y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la penetración de la cutícula (Wessels, 1999). El apresorio sirve para el anclaje de la espora y ejerce una presión hacia el interior del insecto.

Penetración

Después de la germinación de las esporas, se produce una serie de transformaciones físicas y/o químicas, tanto a nivel del tegumento como del conidio, que le permite al patógeno penetrar a la cutícula de su hospedante específico (Lecuona

et al. 1996). El hongo excreta una gran cantidad de enzimas entre las que se incluyen proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas, lipooxigenasas y otras enzimas hidrolíticas, que van degradando la cutícula y proporcionan a su vez nutrientes al hongo (Monzón, 2001). Gillespie, (1988) reportó que los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces* spp. y *V. lecanii*, producen grandes cantidades de proteasas y quitinasas en medios de cultivo líquido. Una vez dentro del insecto, el hongo prolifera formando cuerpos hifales secundarios, posteriormente los cuerpos hifales se encuentran con la capa epidérmica y con su respectiva membrana basal y se diseminan a través del hemocele (Deshpande, 1999). Así, invaden diversas estructuras como tejidos musculares, cuerpos grasos, mitocondrias, hemocitos, retículo endoplásmico y membrana nuclear. Otro mecanismo que utilizan los hongos para penetrar al hemocele es a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas del insecto. Puesto que la humedad no es un problema en el tracto alimenticio, la espora puede germinar rápidamente en este ambiente; aunque los fluidos digestivos pudieran destruirla o degradar la hifa germinativa (Télles Jurado et al., 2009). En algunos casos, la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por la micosis (Charnley, 1992).

Multiplicación del Hongo en el hemocele

Cuando el hongo ataca la cutícula y penetra, puede haber en ella reacciones de melanización en el punto de penetración y posteriormente alrededor de los elementos fúngicos (Lecuona et al. 1996). Una vez en el interior del artrópodo, el hongo se multiplica principalmente por gemación, dando formas miceliares libres y unicelulares llamadas blastosporas. También se producen en el hemocele hifas y protoplastos o células sin pared (Prasertphon y Tanada, 1968; Tyrrell, 1977). Cabe destacar que durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrimentos pero otros pueden inhibir su crecimiento, ya que el insecto activa su sistema inmune a través de procesos como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (St. Leger y Roberts, 1997). El principal mecanismo de defensa de los artrópodos frente a los propágulos de hongos es la encapsulación, la cual se produce por la concentración de plasmocitos o granulocitos alrededor del punto de infección, logrando así formar una masa pseudotisular llamada granuloma (Vey, 1971; Vey y Vago, 1971). Sin embargo, los hongos desarrollan una

serie de actividades que les permiten evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomodulatorias o toxinas fúngicas (Khachatourians, 1991).

Producción de Toxinas

No todos los hongos o todas las cepas de una misma especie fúngica producen toxinas en el hemocèle (Lecuona et al. 1996). Sin embargo, varias especies de HE son capaces de producir ácidos orgánicos y algunos de ellos han sido implicados en el proceso infectivo (Díaz et al., 2006). Estas toxinas son sustancias que pueden, en ciertos casos, originar la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas pero además, ellas actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del hospedante por alteraciones de los hemocitos y retardo en la agregación de las células de la hemolinfa (Vey y Götz, 1986). Por ejemplo, se ha reportado la producción de ácido oxálico por *Beauveria* spp., *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Metarhizium anisopliae* (Hegedus y Khachatourians, 1995; Asaff et al., 2006). Este compuesto ha sido descrito como un factor de virulencia en hongos fitopatógenos y se ha sugerido que en el caso de los HE puede ser un elemento que coadyuve a la solubilización de la proteína cuticular (Bidochka y Khachatourians, 1991). También se han reportado toxinas peptídicas cíclicas y lineales. A las primeras pertenece una familia de péptidos conocidos como depsipéptidos. El primer compuesto de esta naturaleza en ser caracterizado fue la beauvericina, extraída del micelio de *B. bassiana*, y posteriormente se han aislado de diferentes especies de *Fusarium* y *Paecilomyces* (Logrieco et al., 1998). La acción insecticida de estos depsipéptidos es específica para ciertos grupos de insectos y su toxicidad se debe a la acción sinérgica de un complejo de compuestos, entre los que se incluye la beauvericina (Díaz et al., 2006). También se ha observado que diferentes macromoléculas de naturaleza proteica tienen un efecto insecticida notable como las proteínas melanizantes de *B. bassiana* (Fuguet y Vey, 2004; Fuguet et al., 2004), una glicoproteína de *B. sulfurescens* (Mollier et al., 1994) y la hirsutellina A, aislada de *Hirsutella thompsonii* (Wei-Zhen et al., 1995).

Muerte del insecto

La muerte del insecto parasitado por un hongo del orden Hypocreales ocurre generalmente antes que el hongo colonice todo el interior del hemocèle. Ella es originada, en parte, por la acción de las sustancias tóxicas secretadas por el hongo. La muerte del hospedante marca el final de la fase parasítica para continuar creciendo

saprofíticamente por todos los tejidos y compitiendo, en ciertos insectos con la flora bacteriana intestinal (Lecuona et al. 1996). La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Bustillo, 2001). Estas toxinas son sustancias que pueden, en ciertos casos, originar la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas pero además, ellas actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del hospedante por alteraciones de los hemocitos y retardo en la agregación de las células de la hemolinfa (Vey y Götz, 1986). Dentro de estas toxinas, las destruxinas causan parálisis al insecto por su habilidad de abrir los canales de calcio (Pal et al., 2007), así como otras toxinas que dañan el sistema muscular y los tubos de Malpighi, afectando la excreción y dificultando su capacidad de alimentarse y moverse (Pal et al., 2007), para finalmente ocasionar la muerte del insecto (Franco et al., 2011).

Colonización total

Cuando los nutrientes provenientes del artrópodo se van agotando, particularmente las fuentes de nitrógeno, el hongo retoma su crecimiento micelial (Freimoser et al., 2003). El micelio invade todos los órganos y tejidos, comenzando en ciertos casos por el tejido graso. Después de la colonización total, aunque en algunos casos el hongo llega a respetar algunos tejidos como glándulas, músculos y tráqueas (Pekrul y Grula, 1979), el cadáver se transforma en una momia resistente a la descomposición bacteriana. Estas momias sirven como reservorio del hongo para pasar las condiciones climáticas adversas (Madelin, 1963; Ferron, 1981).

Emergencia del hongo hacia el exterior

El hongo se encuentra formando una gran masa de micelio en el interior del hospedante, manteniendo intacto su tegumento. Puede permanecer de esta forma en cuanto las condiciones de humedad relativa sean bajas. En cambio, en ambientes húmedos y cálidos logrará atravesar nuevamente el tegumento, pero esta vez desde el interior hacia el exterior del insecto (Gillespie y Claydon, 1989; Lecuona et al., 1996). Generalmente emerge por las regiones menos esclerosadas del tegumento, pero esto dependerá del hospedante y de su estado de desarrollo (Lecuona et al., 1996).

Esporulación

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

a tomar una coloración que será característica para cada especie fúngica. La esporulación ocurre generalmente en cadáveres pero puede también ocurrir en insectos vivos (Tanada y Kaya, 1993). Finalmente la dispersión de los conidios puede ser un proceso activo o pasivo y depende de las características de la spora y el esporangio. Cada spora puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión (Tanada y Kaya, 1993).

1.2.9 Efectos subletales de hongos entomopatógenos

Es importante tener en cuenta los efectos secundarios que producen estos organismos entomopatógenos sobre los artrópodos hospedantes. Si bien el resultado de la infección generalmente es la muerte, existen estados previos a ella en el cual el artrópodo se ve afectado. Varios trabajos reportan que la muerte del artrópodo infectado con HE requiere varios días, a diferencia de los insecticidas de síntesis química que en general presentan valores elevados de poder de volteo; sin embargo, se ha demostrado que el daño en el cultivo de los insectos parasitados con HE no aumenta, por más que la muerte no se produzca de inmediato. Las alteraciones comportamentales producidas por estos hongos afectan parámetros esenciales para la evolución de los patógenos y los hospedadores, como la transmisión y la longevidad (Roy et al., 2006).

Algunos estudios han investigado el efecto de la infección fúngica sobre la alimentación de distintos insectos hospedadores (Roy et al., 2006). Los resultados muestran que en laboratorio, sobre larvas de insectos fitófagos lepidópteros y coleópteros, existe una disminución en el consumo de alimento de larvas infectadas con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respecto a las sanas, probablemente debido a una disminución de la actividad de los insectos infectados (Ekesi, 2001; France et al., 2002; Tefera y Pringle, 2003). Otro efecto es el aumento de la temperatura corporal del artrópodo, entrando en un estado de “fiebre” el cual estimula al mismo a buscar lugares más frescos e interfiriendo con su normal desarrollo. En consecuencia, esta “fiebre” es una respuesta común de los hospedadores hacia varios tipos de entomopatógenos (Moore, 2002). Por otro lado, dentro de los efectos subletales se encuentran los que repercuten en el “fitness” del artrópodo, estando relacionado la capacidad de generar descendientes viables. Los HE producen tanto efectos directos en la fecundidad, como cambios en la producción y en la respuesta a las feromonas sexuales (Nussenbaum, 2014). Estudios en hongos hipocreales han demostrado que los hospedadores infectados

generalmente producen menor progenie (Baverstock et al., 2006). Nussenbaum y Lecuona (2012a) evaluaron el efecto de la infección fúngica sobre el comportamiento de alimentación de los adultos del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* y observaron una reducción en el peso de los adultos infectados con la cepa Ma 20 de *M. anisopliae*, también el número medio de puntos de alimentación difirió del testigo a las 72 y 96 hs de tratados.

1.2.10 Factores que intervienen en el desarrollo de los hongos entomopatógenos

Para que la manifestación epizootica de los HE tenga lugar, los factores bióticos y abióticos tienen una enorme influencia. Entre los factores abióticos que afectan la viabilidad y la persistencia de estos organismos en el campo se encuentran los rayos ultravioleta, la temperatura, la humedad y los fungicidas. La susceptibilidad y la relación con los hospederos se relacionan con los nutrientes presentes en los insectos, que son el medio de propagación, dispersión y persistencia de los hongos (Díaz et al., 2006).

Para un desarrollo exitoso como agentes de control microbiano, los HE deben estar adaptados a las condiciones climáticas a las cuales será expuesto, en particular la temperatura en el lugar en que va a ser empleado (Tefera y Pringle, 2003; Li y Feng, 2009). La temperatura afecta la supervivencia de los conidios y la capacidad infectiva del patógeno, tanto como la susceptibilidad, resistencia y supervivencia media de los hospedadores (Roy et al., 2006). El conocimiento del efecto de la temperatura sobre el crecimiento fúngico puede ser considerado como un punto de partida para la selección de cepas adaptadas a ambientes particulares (Vidal et al. 1997; Devi et al. 2005). La temperatura óptima para el máximo desarrollo, germinación y esporulación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* ocurre entre los 20 y 30 °C, siendo el óptimo a los 28 °C. Sin embargo entre los 15 y 35 °C se observa un buen porcentaje de germinación, pero con más de 35 °C este proceso se ve retrasado (Pacheco, 2002). Lecuona et al., (2001), evaluaron el efecto de diferentes temperaturas (18, 22, 26, 30, y 34 °C) y humedades relativas (35 y 90 % de HR) sobre la mortalidad de las ninfas de la vinchuca *Triatoma infestans* causada por *B. bassiana*, y observaron que la mortalidad más alta ocurrió con una temperatura de 26 °C, mientras que la humedad relativa no afectó la mortalidad de las ninfas de *T. infestans*. Doberski (1981), realizó ensayos para determinar el efecto de la humedad y temperatura de HE, encontrando que *P. farinosus* y *B. bassiana* infestaron

a temperatura de 2 °C contrario a *M. anisopliae* que no tiene efectividad por debajo de los 10 °C, concluyendo que los hongos actúan de manera significativa a temperaturas de 15 a 20 °C pero la óptima es de 25 °C, hallando similitud con los resultados de Hallsworth y Magan (1999), quienes afirman que los rangos de temperatura para el crecimiento óptimo de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. farinosus* son de 25, 30 y 20 °C, respectivamente. Ortiz-Catón et al, (2011), reportan temperaturas base de crecimiento de hongos de 10 °C para *B. bassiana* y *Verticillium lecanii*, siendo los valores más bajos obtenidos en su estudio. Nussenbaum y Lecuona (2012b), observaron el efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial de dos cepas de *B. bassiana* y una de *M. anisopliae* seleccionadas para el control del picudo del algodón (*A. grandis*) y concluyeron que la tasa de crecimiento más alta estaba en 27 °C para todos los aislamientos; a los 30 y 35 °C, la cepa de *M. anisopliae* mostró una tasa de crecimiento superior a las de *B. bassiana*, y todas fueron inhibidas a 38 °C.

El éxito de lograr un desarrollo masivo del control de plagas mediante el uso de HE está relacionado por las condiciones de humedad relativa del ambiente en el cual se desarrolla la plaga. La humedad ambiental afecta en gran medida a la mayoría de los procesos de los hongos tanto internos (desarrollo e invasión) como externos (germinación y esporulación) que se dan en su hospedante (Kruger, 2014). En el caso de la germinación se requieren altos porcentajes de humedad que van del 90 al 100 %; cuando el nivel de humedad se encuentra por debajo del 90 % decrece la germinación de los conidios (Camargo, 2000). De igual manera Doberski (1981), evaluó humedades relativas que variaron desde el 51 al 100%, hallando que *P. farinosus* no tiene efecto en bajas humedades contrario con los otros dos hongos. Aislamientos de *Paecilomyces* spp. a 27°C y humedad relativa de 70 a 100% causaron del 70 al 90% de mortalidad en ninfas y 60 a 70% en adultos de *B. tabaci* (Hernández et al, 1995).

La radiación solar, en particular los componentes UV-A (320-400nm) y UV-B (280-320 nm), es uno de los factores de mayor mortalidad de conidios y responsable de la corta persistencia de los micoinsecticidas en el campo (Nussenbaum et al., 2013). Por esta razón, muchos estudios se basan en buscar cepas con alta resistencia natural a esta radiación y evaluar distintos fotoprotectores que puedan ser adicionados en la formulación sin incrementar demasiado los costos del producto final (Jaronski, 2010). Por otro lado, la utilización conjunta y en simultaneo de estos hongos con insecticidas o herbicidas incompatibles, puede inhibir el desarrollo y reproducción de los patógenos, no obteniendo el control esperado de la plaga (Hirose et al., 2001).

1.2.11 Propiedades de los hongos entomopatógenos

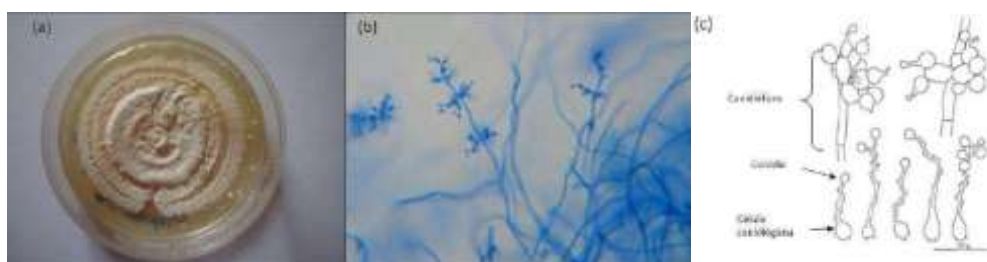
Los HE están siendo estudiados y aplicados en el mundo por su eficiencia en matar a distintos artrópodos plagas, permanecer un tiempo largo en el campo después de su aplicación, por su interacción específica con el hospedante y por ser relativamente seguros respecto al medio ambiente (Franco et al, 2011). Dentro de los aspectos a tener en cuenta para que estos tengan éxito en su ocurrencia epizoótica está la patogenicidad, virulencia, dispersión, supervivencia en el ambiente, densidad y distribución espacial del inóculo. La patogenicidad se refiere a la habilidad de un organismo para causar enfermedad (característica cualitativa), mientras que la virulencia se refiere a la intensidad de la enfermedad causada por un patógeno (propiedad cuantitativa) (Lecuona, 1996). Meyling y Eilenberg (2007), afirman que para su utilización como control biológico es necesario prácticas agrícolas en donde se manipule el ambiente para beneficiar las poblaciones de entomopatógenos, donde el conocimiento de los aspectos ecológicos del hongo son necesarios, tales como la humedad relativa, temperatura, patogenicidad, virulencia y hospederos a los que infecta activamente.

1.2.12 *Beauveria bassiana* (Bálsamo - Crivelli) Vuillemin 1912

Beauveria bassiana es un hongo que pertenece al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Cordycipitaceae. Este hongo ha sido encontrando atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de importancia agrícola (Alves, 1986). *Beauveria* es un género de hongos anamórficos cosmopolitas, habitantes del suelo, necrótrofos, patógenos facultativos de artrópodos (Roberts y Hajek, 1992; Goettel et al., 2005) que se los puede encontrar también como saprótrofos y como endófitos en plantas (Vega et al., 2008).

El género *Beauveria* es caracterizado morfológicamente por células conidiógenas globosas con forma de botella formadas por una única célula, conidios terminales holoblásticos con disposición simpodial sobre un raquis denticulado indeterminado. Los artrópodos muertos por este hongo, presentan una coloración blanquecina en forma algodonosa, generada por la exposición de los micelios y conidios de color blanco (Figura 8-a, b, c).

La principal ventaja de este género se atribuye a su distribución cosmopolita, su fácil reconocimiento y su frecuente aparición en la naturaleza; como así también a su extremadamente amplio espectro de hospedadores susceptibles y su gran variabilidad en cuanto a virulencia (Vega y Blackwell, 2005). Estos atributos confieren la particularidad de ser ampliamente adoptados para el control de artrópodos en todo el mundo, siendo el más utilizado en el desarrollo de bioplaguicidas.



Adaptado: Nussenbaum (2014)

Fig. 8: **a)** Colonia monospórica de *Beauveria bassiana* crecida sobre una placa de Petri con medio de cultivo agarizado (AMC); **b)** Estructuras de fructificación de *Beauveria bassiana* bajo microscopio óptico, teñidas con azul de algodón en lactofenol de Ammann 0,5% p/ v (400X); **c)** Estructuras de fructificación de *Beauveria bassiana*.

Como el resto de los HE, la duración de las diferentes fases del ciclo depende de la especie de artrópodo involucrado y de las condiciones ambientales, siendo las más favorables: humedad relativa cercana al 90 % y una temperatura ambiente entre 23 y 28 °C (Alves, 1986). Generalmente, entre 48 a 72 hs después de la inoculación, el artrópodo se halla totalmente colonizado por el hongo observándose importantes cantidades de conidióforos y conidios.

1.2.13 *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin

Metarhizium anisopliae pertenece al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae. Este patógeno ataca naturalmente diversos órdenes de insectos y ácaros (Alves, 1986). Presenta la habilidad de crecer en forma saprofita, facilidad de diseminación de los conidios, capacidad de sobrevivencia en el suelo y reproducción asexual. Requiere temperatura óptima de 25 a 30 °C y humedad relativa cercana al 100%. Los límites térmicos para la germinación de los conidios y de las hifas de *M. anisopliae* se encuentran alrededor de 37 a 40 °C respectivamente. A una humedad por debajo de 53% se reduce la viabilidad de los conidios (Ojeda-Chi et al., 2011). La germinación ocurre aproximadamente a las 12 hs post-inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 hs post-inoculación. En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por estructura de la penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 o 4 días después de la inoculación. A partir de la colonización se forman pequeñas

Rampoldi, Andrés

colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto, ocurre 4 o 5 días después de la inoculación. (Castillo, 2006). Se le considera un agente de alto potencial en el control biológico de plagas agrícolas. Es una especie de hongo cosmopolita que no infecta animales de sangre caliente y tampoco existen reportes de sensibilidad humana al mismo (Zimmermann, 2007, Bazán, 2002). Entre las características morfológicas se destacan la coloración de la colonia, generalmente olivácea, amarillenta o verde oscura, dependiendo del aislamiento. El conidióforo es irregular y ramificado con dos a tres ramas en cada septa (Figura 9-a, b). Conidios unicelulares, cilíndricos y truncados, formados en cadenas muy largas, hialinos a verde oliváceo. Miden 3.5 a 9 μm de longitud x 1.5 a 3.5 μm de diámetro (Orduño, 2009).

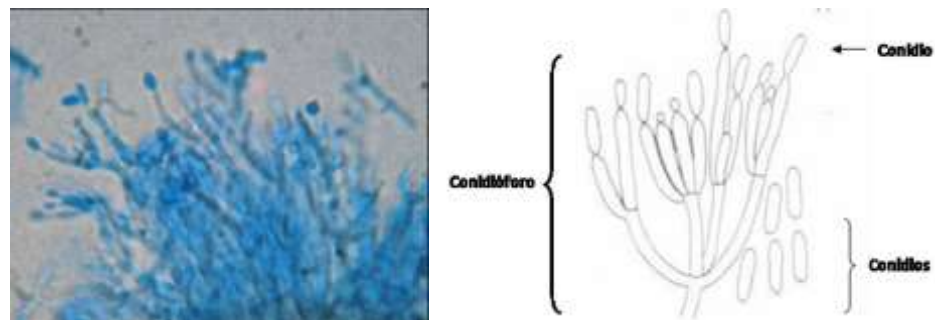


Fig. 9: Estructuras de fructificación de *Metarhizium anisopliae* bajo microscopio óptico, teñidas con azul de algodón en lactofenol de Ammann 0,5 % p/v (400 X). Imagen Posadas y Lecuona, 2009.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 General

Seleccionar cepas de hongos entomopatógenos (HE) de las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* para llevar a cabo el control microbiano de *Oebalus poecilus* en el marco de la estrategia de Manejo Integrado de Plagas.

1.3.2 Específicos

- 1-Aislar e identificar cepas de HE a partir de cadáveres de *O. poecilus* recolectados a campo.
- 2-Realizar bioensayos para seleccionar las cepas de HE patógenas.
- 3-Determinar la virulencia de las cepas seleccionadas mediante el cálculo de la CL_{50} .
- 4-Evaluar la compatibilidad de las cepas virulentas con productos comerciales que se utilizan en el cultivo de arroz.

Para realizar estos objetivos, se llevaron a cabo una serie de experimentos en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (LHE) del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) del INTA Castelar, como también a campo en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Concepción del Uruguay.

1.4 HIPÓTESIS

Hipótesis 1: Los aislamientos de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* son efectivos y pueden ser utilizados para el control microbiano de *O. poecilus*.

Hipótesis 2: Es posible utilizar estos hongos entomopatógenos en el plan de manejo del cultivo en aplicaciones conjuntas con productos comerciales.

CAPÍTULO 2

Monitoreo de sitios de hibernación, recolección y aislamiento de material

2.1 INTRODUCCIÓN

La región productora de arroz de Entre Ríos se concentra en su gran mayoría en el centro-norte de la Provincia. El ambiente que se genera en esta región, por la presencia del cultivo inundado, existencia de embalses o represas para contener agua, la cual es utilizada para efectuar el riego, sectores de monte nativo y grandes extensiones de pasturas naturales, originan un propicio lugar para el desarrollo de insectos plagas, los cuales se ven favorecidos por tener sectores de protección donde resguardarse (montes, pasturas naturales, pajonales, etc.) en las estaciones más frías del año.

Según algunos autores, la chinche de la panoja del arroz *Oebalus poecilus*, prefiere especies de gramíneas en general para refugiarse en la estación invernal. Santos et. al., (2006) reportan la captura de 4.162 adultos de *O. poecilus* los cuales se obtuvieron de una zona con caña de bambú. Panizzi (1997) informa que esta chinche también se alimenta de varias hierbas silvestres, tales como *Echinochloa crus-galli*, *Echinochloa colonum*, *Digitaria sanguinalis*, *Panicum dicotomiflorum*, *Phalaris minor*, *Paspalum urvillei* y *Sporobolus poiretti*, siendo preferidas las dos últimas.

En su trabajo Santos et al., (2006) mencionaron que la mortalidad de esta chinche fue del 15,8 % en 2000 y 8,4 % en 2001 y, que de estas muertes, la proporción de individuos infectados naturalmente por el hongo *Beauveria bassiana* fue del 79,2 % en 2000 y 60,2 % en 2001. Lecuona (1996) reportó que se conoce la ocurrencia natural de enfermedades sobre los insectos de diferentes órdenes, siendo los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* los entomopatógenos más ampliamente utilizados en el manejo de insectos plagas de importancia en la agricultura. En Argentina no existe información referida al control microbiano de este insecto, es por ello que se presenta una buena oportunidad para llevar a cabo este trabajo ante la necesidad de buscar alternativas menos contaminantes para el control de esta chinche.

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

- a) Obtener ejemplares adultos de *O. poecilus* para poder establecer la cría en laboratorio.

- b) Identificar sitios de hibernación de este insecto en lotes de producción de arroz de la Provincia de Entre Ríos.
- c) Aislar hongos entomopatógenos nativos a partir de insectos adultos muertos recolectados en los sitios de hibernación.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 *Recolección de material experimental*

La recolección del material experimental tuvo lugar durante la época de invierno y primavera del 2010, iniciando los muestreos en julio y finalizando en noviembre. Para determinar los sitios donde realizar la recolección de chinches, se estableció contacto telefónico (datos brindados por Fundación PROARROZ) con gran parte de los productores de la provincia de Entre Ríos, a quienes por medio de una simple encuesta, se les solicitó información necesaria para diagramar la búsqueda.

Los lotes estuvieron ubicados en diferentes localidades, las cuales se nuclearon en cuatro zonas: Zona Sur de Corrientes (Mocoreta-Monte Caseros), Zona Norte de Entre Ríos (San Jaime, Los Conquistadores, Chajarí, El Redomón), Zona Centro de Entre Ríos (Villaguay, San Salvador), Zona Sur de Entre Ríos (Perdices, Costa del Uruguay Sur). En la Figura 10 se muestran las localidades y sitios de monitoreo y recolección de insectos en las arroceras. Es de destacar que las Zonas Centro-Norte de la Provincia de Entre Ríos nuclean más del 85% de las arroceras de la Provincia.



Fig. 10: Ubicación de zonas de recolección de chinches.

Se realizó la búsqueda y recolección de chinches por medio de red entomológica de arrastre (Figura 11-a, b) y observaciones visuales en sitios de muestreos aleatorios (Figuras 12), se recolectaron insectos tanto muertos como vivos en las zonas arroceras (lotes arroceros, cultivos aledaños, canales, caminos y montes cercanos).

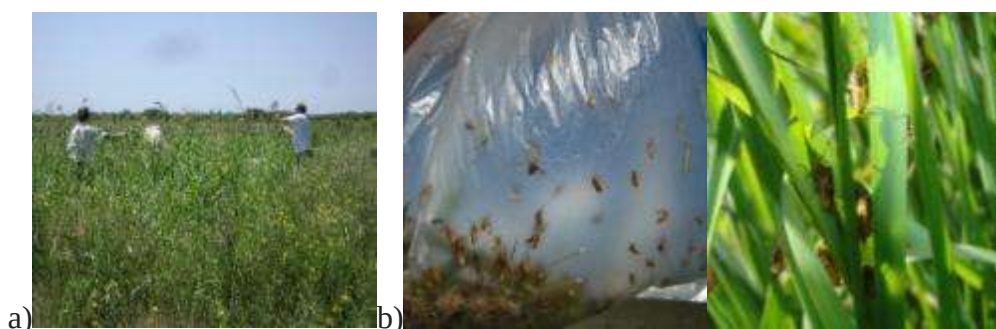


Fig. 11: **a)** Método de red entomológica de arrastre para la búsqueda de *Oebalus poecilus* en sitios de hibernación. **b)** Insectos capturados y observación visual en matas de gramíneas.



Fig. 12: Sitios de muestreo en lotes arroceros y zonas aledañas.

2.2.2 Cría y mantenimiento de *O. poecilus* en laboratorio

Con los adultos vivos obtenidos de la recolección en lotes arroceros, se procedió a establecer una cría en laboratorio. En primer lugar, los adultos se colocaron en una sala con plantas de arroz cultivadas en invernáculo, por espacio de 15 días para evitar contaminación de las cámaras de cría por cualquier agente patógeno o parasitario que pudiera venir del campo.

Luego se colocaron los adultos en jaulas de madera cubiertas por tul blanco (Figura 13), como fuente de alimento se le proveyó inicialmente plantas de arroz (Variedad GURI INTA-CL) cultivadas en invernáculo y sembradas cada 15 días para asegurar el abastecimiento constante de alimento fresco. Estas jaulas fueron colocadas dentro de un invernáculo de vidrio, climatizado a 24 ± 1 °C y un fotoperíodo de 14:10 con fuente de luz halógena y para proveer humedad se colocaron bandejas de agua en los laterales y dentro de las jaulas, las cuales se reponían diariamente para mantener la misma en el orden del 75%.



Fig. 13: Imagen de la jaula de cría utilizada para los insectos recién recolectados.

Los adultos copularon y ovipusieron. Los huevos fueron recolectados cada dos días y se colocaron en cajas de Petri con papel tissue húmedo, finalmente se llevaron a una cámara de incubación a 25 °C. Luego de eclosionadas las ninfas se colocaron en otra cámara donde se les brindó alimento a base de solución de miel (colocada en recipiente que contenía un trozo de goma espuma) hasta que pasaran a ninfa 2, las cuales fueron llevadas a las plantas de arroz nuevamente.

Durante el período de cría se brindaron diferentes fuentes de alimento (Figura 14), las mismas constaron de plantas de arroz en crecimiento, las cuales fueron obtenidas en cámaras de cultivo en laboratorio, soluciones azucaradas a base de miel, semillas de capín humedecidas y granos de maní crudo pelado para proveer la fuente energética necesaria para iniciar la actividad sexual.

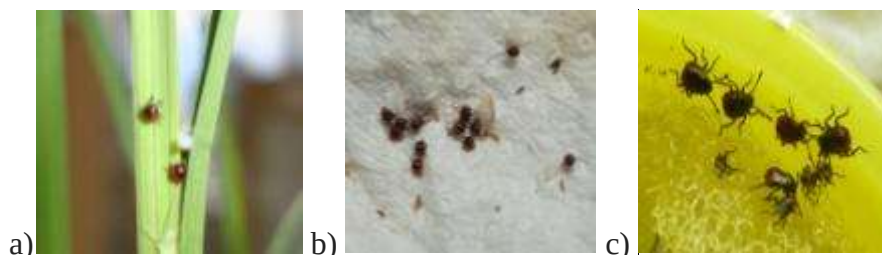


Fig. 14: Ninfas de *Oebalus poecilus* en cría, con diferentes fuentes de alimentación. **a)** Plantas de arroz, **b)** Semillas de capín humedecidas, **c)** Solución azucarada

2.2.3 Aislamiento de hongos entomopatógenos nativos sobre cadáveres de *O. poecilus*

Con los insectos muertos recolectados en los diferentes muestreos se procedió a la desinfección y posterior incubación para permitir la esporulación del hongo.

Cada cadáver fue colocado individualmente en alcohol 70% durante 1 min. Luego, se sumergió en hipoclorito de sodio al 1% por 1 min y finalmente, se lo colocó en agua destilada estéril durante 1 a 1,5 min. Posteriormente se secó cuidadosamente el cadáver sobre papel de filtro para retirar el exceso de humedad y se lo incubó en una cámara húmeda durante 4-5 días a una temperatura de 25-27 °C.

Una vez verificado el crecimiento fúngico se procedió a su aislamiento. Para *B. bassiana* se utilizó Medio Completo (MC: (g/l): KH_2PO_4 , 0,4; Na_2HPO_4 , 1,4; SO_4Mg , 0,6; KCl, 1; NH_4NO_3 , 0,7; Glucosa, 10; Agar, 15; Extracto de levadura, 5; Cloranfenicol, 0,5 g/l), para *P. lilacinus* y *M. anisopliae* se utilizó Papa Dextrosa Agar (PDA (Merk®)) con la adición de Cloranfenicol, 0,5 g/l), y para aquellos hongos que no pudieron identificarse en el cadáver del insecto se usó un medio en base a avena (OACTAB más Cloranfenicol) (Posadas et al., 2012). Luego las placas fueron incubadas a 27 ± 1 °C por aproximadamente una semana. Después del crecimiento y esporulación, las cepas aisladas se almacenaron a 10 °C y se incorporaron a la micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (LHE- IMYZA, INTA, Castelar).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 *Recolección de material experimental*

Se efectuaron recolecciones en un total de 24 sitios en lotes que en la campaña anterior tuvieron cultivo de arroz y otros donde en esta campaña se desarrollaba dicho cultivo. Se obtuvieron un total 356 adultos de *O. poecilus*, de los cuales casi el 90% (320) de ellos estaban vivos y fueron llevados a cría en laboratorio (Tabla 2).

Durante el período de muestreo, no se observaron estadios ninfales ni tampoco oviposiciones, lo cual demuestra lo reportado por la bibliografía que el estado de diapausa lo transcurre como adulto.

Es importante mencionar que los mayores recuentos de ejemplares se dieron en sectores donde fueran indicados por los propietarios de los campos y que coincidentemente en la campaña anterior tuvieron focos y problemas. Esto demuestra que si bien esta especie rara vez queda dentro del rastrojo o lote con rastrojo del cultivo, migra a sectores de resguardo cercanos al mismo, siendo los sectores de valetones (canal principal de aporte de agua en las arroceras), canales de conducción de agua, caminos, alambrados, zonas de pasturas naturales y montes linderos los que mayor recuento de adultos presentaron. Los mayores recuentos (40% del total) se efectuaron en la zona Norte de Entre Ríos y dentro de esta zona los sitios donde mayores ejemplares aportaron fue valetones y canales (55% del total de la zona), donde se dieron las mayores denuncias de ataques de chinches en cultivos de arroz. Como segundo lugar se encuentra la Zona Sur de Corrientes, la cual represento el 30% del total de recuentos y un 50% del total de la zona fue recolectado en valetones y canales (Tabla 2). Esta distribución dentro de cada zona y sitio representa la importancia de la biología de esta especie, dejando en claro que su movilidad afuera del lote tiende a ser la menor posible, quedando resguardada en zonas cercanas a lotes que tuvieron arroz.

Tabla 2: Resultados del muestreo y recolección de *Oebalus poecilus* durante el año 2011 en Entre Ríos y sur de Corrientes

Zona de muestreo	Sitio de muestreo	Adultos de <i>O. poecilus</i>		
		Vivos	Muertos	
			Sin hongos	Con hongos
Sur de Corrientes	Valetones y canales	48	5	0
	Caminos	10	3	0
	Isletas, alambrados y montes	29	4	0
	Rastrojos de arroz	9	0	0
Norte de Entre Ríos	Valetones y canales	70	8	2
	Caminos	13	1	0
	Isletas, alambrados y montes	38	4	1
	Rastrojos de arroz	7	1	0
Centro de Entre Ríos	Valetones y canales	38	4	0
	Caminos	3	0	0
	Isletas, alambrados y montes	21	2	0
	Rastrojos de arroz	2	0	0
Sur de Entre Ríos	Valetones y canales	19	3	0
	Caminos	2	0	0
	Isletas, alambrados y montes	11	1	0
	Rastrojos de arroz	0	0	0
Total		320	36	

Como se puede observar, la cantidad de insectos muertos recolectados en los monitoreos fue relativamente baja, no superando el 10% del total de insectos recolectados. Valores similares reportan Santos et al., (2006) quienes describen que la mortalidad de *O. poecilus* fue del 15,8 % en 2000 y 8,4 % en 2001, durante la hibernación en la hojarasca de bambú. Es importante destacar el comportamiento de agregación en el sitio de hibernación encontrado en los monitoreos. Esto también es reportado por Santos et al., (2004) quienes describen la importancia del índice de agregación encontrado para *O. poecilus* durante dos campañas, describiendo que la agregación durante la hibernación parece ser el resultado de numerosos factores tales como: protección de las temperaturas bajas (Holmquist 1931) la existencia de una condición abiótica preponderante en la población local (Bullock 1967), la limitada disponibilidad de refugios adecuados (Danks, 1978) o las respuestas de comportamiento a la heterogeneidad del hábitat en relación con factores tales como humedad, temperatura, sombreado y viento (Mielitz, 1993). Holmquist (1931) reportó que los refugios de hibernación son elegidos por insectos debido a que tienen un rango menor

Rampoldi, Andrés

de variación de temperatura y humedad relativa, los cuales según Salin et al., (2000) crea un entorno más estable para pasar el invierno. Por lo tanto, el bajo número de individuos recolectados, se vio afectado por el manejo que efectuaron los productores sobre las áreas de hibernación, siendo una de las prácticas más comunes la aplicación de herbicidas y posterior control con fuego para reducir la presión de malezas y plagas en los lotes (Figura 15).



Fig. 15: Sector de campo natural en borde de arrocería con control de herbicida

Las especies preferidas por este insecto al momento de buscar sitios de hibernación fueron las siguientes en orden de importancia: *Echinochloa* spp., *Sorghum halepense*, *Stypa brachychaeta*, *Chloris virgata*, *Cyperus* spp., *Lolium perene* (Figura 16), especies que presentan gran volumen de material aéreo propicio para generar refugio a estos artrópodos.



Fig. 16: Especies donde se obtuvieron los mayores recuentos de *Oebalus poecilus*. **a)** *Echinochloa* spp., **b)** *Sorghum halepense*, **c)** *Stypa brachychaeta*, **d)** *Chloris virgata*

Existen muchos reportes de hospedantes alternativos para esta especie, Panizzi (1997) menciona a: *Echinochloa crus-galli*, *Echinochloa colonum*, *Digitaria sanguinalis*, *Panicum dicotomiflorum*, *Phalaris minor*, *Paspalum urvillei* y *Sporobolus poiretti*. Estas especies se comparten con lo reportado por Garbelotto (2008), quien describe diferentes hospedantes en los que puede encontrarse chinche: *Lolium multiflorum*; *Echinochloa cruzgalli* var. *cruzgalli*; *Paspalum urvillei*; *Panicum sanguinale*. El hecho que exista una gran variedad de hospederos para esta especie se refiere a su habilidad para poder permanecer en momentos donde el cultivo no está, o en etapas del año donde las condiciones no son propicias para un libre desarrollo. Como reporta Panizzi (1997), la supervivencia de pentatómidos fitófagos depende de la aparición sucesiva de plantas hospedadoras. Por otra parte, los diferentes hábitats de hibernación tienen un impacto variable sobre la supervivencia durante el invierno para la mayoría de los pentatómidos.

2.2.2 Cría y mantenimiento de *O. poecilus* en laboratorio

Los adultos vivos, obtenidos de la recolección en lotes arroceros que se colocaron en la cría sobre plantas de arroz variedad GURÍ INTA-CL, copularon y efectuaron la postura de huevos, los cuales se colocaron en cámara de incubación. De estos huevos eclosionaron ninfas en alrededor del 95% de los casos y del total en estado de ninfa 1, el 90% logró llegar a ninfa 2 que fue el estadio donde se pasaron a plantas de arroz.

Es importante destacar que los días requeridos para efectuar las mudas y demás parámetros biológico no se midieron durante la cría, ya que no fue el objetivo de la misma, sino proveer insectos adultos sanos.

Un punto a remarcar en el desarrollo de la cría es que no se logró establecer la misma en su totalidad. Si bien se logró la copula, con las subsiguientes posturas, eclosión de ninfas y desarrollo hasta el estado adulto (un 40% del total), estos adultos no tuvieron comportamiento de cópula. Esto dificultó la continuidad de la misma y la posibilidad de disponer de individuos para futuros ensayos. Ante esta problemática se buscaron alternativas alimenticias para promover el comportamiento de cópula de los adultos, brindando diferentes fuentes como: granos de maní con cáscara y sin tostar, soluciones de miel complementarias a la plantas de arroz, granos humedecidos de Rampoldi, Andrés

plantas hospedantes como *Echinochloa* spp. y *Sorghum* sp., no logrando resultados positivos. Este comportamiento diferencial de cópula podría deberse a la fuente de alimentación, como reportan Mourão y Panizzi (2000), quienes encontraron un gran número de hembras maduras de *Euschistus heros* en el período de marzo a noviembre, cuando los insectos se alimentaron de plantas de soja y girasol fuera de los refugios de hibernación. Esto se asocia a lo mencionado por Panizzi (1997), quien reporta que ninfas de pentatómidos suelen tardar más tiempo para desarrollarse y presentan mayores tasas de mortalidad en hospedantes alternativos en comparación con cultivos como la soja. A su vez, Greve et al., (2003) mencionan que mantienen a *O. poecilus* sobre *Echinochloa* spp. ya que fue su principal hospedante al ser recolectados del campo. Es de destacar que en la bibliografía no se documentan crías masivas en laboratorio para esta especie, en la cual se puedan obtener varias generaciones a partir de una población inicial. Solo se documentan trabajos donde mantienen en laboratorio los ejemplares adultos y en algunos casos, se obtienen adultos a partir de huevos; siendo resultados similares a los obtenidos en esta tesis.

2.2.3 Aislamiento de hongos entomopatógenos nativos sobre cadáveres de *O. poecilus*

Del total (356) de adultos recolectados en los monitoreos, 36 estaban muertos en los sitios de hibernación, los mismos fueron guardados y fichados con la zona y sitio de donde se recolectaron para luego colocarlos en incubación. De las 36 chinches incubadas se obtuvieron 3 aislamientos que fueron incorporados a la Micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del IMYZA (Tabla 3), de ellos 2 fueron de *Beauveria bassiana* (Bb360 y Bb361) y 1 de *Paecilomyces lilacinus* (Pl 34) (Figura 17).

Tabla 3: Aislamientos de hongos entomopatógenos nativos encontrados en cadáveres de adultos de *Oebalus poecilus*.

<i>Aislamiento N°</i>	<i>Nombre científico</i>	<i>Hospedante Original</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Año</i>
Bb 360	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Oebalus poecilus</i> (Hem: Pentatomidae)	Los Conquistadores, Entre Ríos	2012
Bb 361	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Oebalus poecilus</i> (Hem: Pentatomidae)	Los Conquistadores, Entre Ríos	2012
Pl 34	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Oebalus poecilus</i> (Hem: Pentatomidae)	Los Conquistadores, Entre Ríos	2012

Muchos trabajos a nivel mundial reportan aislamientos de HE en diferentes regiones y sobre distintos sustratos. Carneiro et al., (2008) reportaron que obtuvieron 20

aislamientos de *B. bassiana* y 20 aislamientos de *P. lilacinus* de muestras de suelo. En análisis de ocurrencia de hongo patógenos de insectos en suelos de diferentes regiones de Brasil, *B. bassiana* y *P. lilacinus* fueron detectados con gran frecuencia (Tigano-Milani et al., 1993). En otro trabajo, a partir de un total de 40 muestras de suelo de cultivos de yerba mate de diferentes localidades de la provincia de Misiones (Argentina) se obtuvieron 29 aislamientos correspondientes a HE, siendo 17 cepas de *B. bassiana* (Schapovaloff et al., 2015). Por otro lado, Santos et al., (2002) reportaron la ocurrencia natural de *B. bassiana* sobre adultos de *O. poecilus* recolectados en matas de caña de bambú.

Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson. es un hongo que se encuentra con frecuencia en suelo, siendo este su hábitat más común, y desde allí infecta a los artrópodos. Santos (2003) describe que *P. lilacinus* es un hongo típico de suelo, con amplia distribución en diferentes regiones y es un entomopatógeno de insectos tropicales.

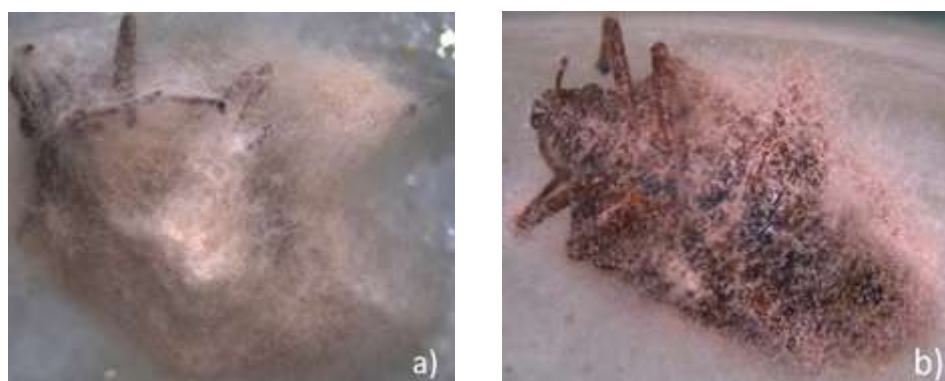


Fig. 17: Adultos de *Oribatida poecilus* hallados muertos en los monitoreos. **a)** Cadáver con *Beauveria bassiana* (Bb); **b)** Cadáver con *Paecilomyces lilacinus* (Pl).

Los resultados obtenidos en este capítulo son de vital importancia, el haber logrado aislar HE nativos de cadáveres adultos de *O. poecilus* nos permite pensar en un planteo de manejo de plagas por medio de agentes de biocontrol, siendo factible de ser aplicado y de perpetuarse en el tiempo, lo cual queda demostrado por los aislamientos encontrados en sitios donde nunca se aplicó este método de control. Es de esperar que con la adopción de este método de manejo se favorezca el aumento de HE en los lotes arroceros.

Para el desarrollo de esta técnica de manejo es necesario realizar varios experimentos de bio-ensayos con cepas de HE, los cuales nos permitan obtener

Rampoldi, Andrés

información de cuando y como aplicar este método de control sobre chinches en los sistemas de producción de lotes arroceros de Entre Ríos.

CAPÍTULO 3

Bioensayos para seleccionar aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de O. poecilus

3.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la búsqueda de alternativas de control de plagas con el menor impacto ambiental y mejores resultados económicos ha motivado la búsqueda de diferentes agentes de control. El uso de hongos entomopatógenos (HE) se ha incrementado notablemente, motivado por su gran practicidad y amplio espectro de control. Como reporta Alves (1998), estos patógenos son altamente eficaces, presentan la capacidad de multiplicarse y tienen gran dispersión en el medio ambiente. Su carácter enzoótico y de no toxicidad para mamíferos son atributos favorables para el desarrollo de control por medio de estos microorganismos, los cuales son capaces de reducir poblaciones de insectos no deseados a niveles de no causar daños considerables. Estos microorganismos infectan a los artrópodos directamente, a través de la penetración de la cutícula y ejercen múltiples mecanismos de acción, confiriéndoles una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia. Los hongos tienen algunas ventajas entre los entomopatógenos ya que son capaces de infectar al hospedero, por contacto y adhesión de las esporas o conidios a las paredes bucales, membranas inter-segmentales o a través de los espiráculos, por lo que la ingestión del microorganismo no es necesaria (Hajek y St. Leger, 1994; Díaz et al., 2006).

Existen más de 750 especies de HE (Feng et al., 1994; Hajek y St. Leger, 1994), entre las que se mencionan: *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Aschersonia* spp., *Entomophthora* spp., *Zoophtora* spp., *Erynia* spp., *Eryniopsis* spp., *Akanthomyces* spp., *Fusarium* spp., *Hirsutella* spp., *Hymenostilbe* spp., *Paecilomyces* spp. y *Verticillium* spp.

Existe una gran variabilidad genética de cepas/aislamientos y de amplio espectro de control sobre especies plagas de varios órdenes. Por lo tanto, es necesario seleccionar aislamientos para el control de una determinada especie de artrópodo a través del muestreo de incidencias naturales y posteriores bioensayos para determinar la virulencia de los aislamientos sobre el artrópodo plaga (Santos et al., 2002; Loureiro et al., 2005).

Los HE que se aplican en el campo también pueden ser afectados por agroquímicos, como los fungicidas, insecticidas o herbicidas (Zimmermann, 1986). Según Tigano-Milani et al., (1995), el uso de bioensayos con condiciones total o parcialmente controladas, es esencial para entender los parámetros que rigen la eficacia y persistencia del patógeno en el medio ambiente, cuando se pretende introducir los organismos de control biológico de plagas. Batista et al., (2001) reportan la importancia de la interacción entre los insecticidas químicos y HE; según los autores, el control de plagas podría ser aún más eficaz si existiría compatibilidad entre el plaguicida y el hongo, ya que el producto químico juega un papel importante debido a su capacidad estresante que facilita la acción rápida y fácil de los HE.

Es importante mencionar que últimamente existe un incremento importante en el uso de agentes de biocontrol, siendo el interés de la mayoría de las investigaciones referidas al tema de desarrollo de micoinsecticidas, es decir, el uso de HE en formulaciones comerciales para uso agropecuario dentro de un programa de MIP. Para seleccionar una cepa de HE es importante identificar las características de virulencia contra el insecto plaga, además de conocer su variabilidad bioquímica, para así seleccionar el aislamiento con las mejores características (Hajek y St. Leger, 1994).

Se destaca que en los siguientes ensayos no fueron incluidas las cepas encontradas en cadáveres de *O. poecilus* mencionadas en el capítulo 2, esto se debe a que ambos ensayos fueron desarrollados en el mismo año, obteniendo los aislamientos purificados e identificados una vez terminado el screening con cepas de la micoteca del IMYZA, que como veremos en este capítulo, obtuvimos buenos resultados de control. Por otro lado, al no haber podido desarrollar la cría artificial de esta especie, condicionó la disponibilidad de insectos para repetir todos los ensayos con estas cepas encontradas, tomando la decisión de dejar los mismos para ensayos a futuro.

Los objetivos de esta etapa fueron:

- a) Seleccionar aislamientos de HE de la micoteca del IMYZA por su patogenicidad y virulencia sobre adultos de *O. poecilus*.
- b) Determinar para el/los aislamiento/s seleccionado/s el Tiempo de Supervivencia Media (ST₅₀) y la Concentración Letal Media (CL₅₀) sobre adultos de *O. poecilus*.
- c) Evaluar la Compatibilidad de lo/s aislamiento/s seleccionado/s con diversos productos fitosanitarios de uso en el cultivo de arroz.

- d) Evaluar el desempeño a campo del aislamiento seleccionado sobre el control de *O. poecilus*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Bioensayos

3.2.1.1 Ensayos de patogenicidad sobre adultos de *O. poecilus*.

Se evaluaron en total 12 aislamientos nativos, de los cuales 10 fueron de *B. bassiana* (Bb) y 2 de *M. anisopliae*. (Ma) (Tabla 4).

Tabla 4: Nomenclatura y origen de los aislamientos evaluados sobre adultos de *Oebalus poecilus*.

Aislamiento N°	Nombre científico	Hospedante Original	Procedencia
Bb 23	<i>B. bassiana</i>	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	Pergamino/BsAs/Arg.
Bb 37	<i>B. bassiana</i>	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	Oliveros/S. Fe/Arg.
Bb 59	<i>B. bassiana</i>	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	Oliveros/S. Fe/Arg.
Bb 61	<i>B. bassiana</i>	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	Oliveros/S. Fe/Arg.
Bb 62	<i>B. bassiana</i>	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	Oliveros/S. Fe/Arg.
Bb 63	<i>B. bassiana</i>	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	Oliveros/S. Fe/Arg.
Bb 64	<i>B. bassiana</i>	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	Oliveros/S. Fe/Arg.
Bb 65	<i>B. bassiana</i>	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	Oliveros/S. Fe/Arg.
Bb 66	<i>B. bassiana</i>	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	Oliveros/S. Fe/Arg.
Bb 301	<i>B. bassiana</i>	<i>Dyscinetus hydrophiloides</i> (Col: Escarabeidae)	Reconquista/S. Fe/Arg.
Ma 20	<i>M. anisopliae</i>	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hym: Formicidae)	Castelar/BsAs/Arg.
Ma 50	<i>M. anisopliae</i>	Suelo	Las Toscas/S. Fe/Arg.

Se prepararon suspensiones de conidios en Tween 80 (0,05%) a partir de los aislamientos crecidos en PDA (*M. anisopliae*) y MC (*B. bassiana*). Las suspensiones fueron ajustadas a 5×10^8 conidios/ml utilizando una cámara de Neubauer. El día antes de la realización del ensayo, los insectos fueron desinfectados superficialmente.

Las unidades experimentales (UE) constaron de un vaso de 0,25 litros de capacidad, con arena esterilizada con 5 panojas de arroz en su interior; los vasos fueron perforados en la parte inferior e introducidos en un recipiente con agua para mantener la humedad, los mismos se cubrieron individualmente con una jaula de plástico (confeccionada a partir de una botella de gaseosa) con perforaciones en los laterales, base y tapa (Figura 18) para permitir el intercambio gaseoso.

En cada UE fueron colocados 5 adultos de *O. poecilus* obtenidos de la cría, los cuales fueron sumergidos en las suspensiones fúngicas durante 15 segundos; el testigo

se sumergió en 30 ml de solución de Tween 80 (0,05 %). El diseño experimental fue completamente al azar, con 3 repeticiones. Después de la aplicación de los tratamientos, las UE fueron incubadas en cámara de crecimiento a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 10\%$ de HR y con 14 horas de fotofase.

Las evaluaciones de mortalidad fueron diarias y por un período de 15 días. Los insectos muertos fueron desinfectados superficialmente, colocados en cámara húmeda e incubados por 15 días a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ con 16 horas de fotofase, para confirmar la micosis. Para efectuar el análisis, para cada cepa se calculó el porcentaje de mortalidad.

Se evaluó la Supervivencia Acumulada (Kaplan-Meier) de las cepas que tuvieron mejor control sobre adultos de *O. poecilus*. Por otro lado, se analizó la Vida Media o ST_{50} de los aislamientos para seleccionar el más efectivo mediante la utilización de modelos cuadráticos. Se estableció arbitrariamente un límite mínimo de 70 % de mortalidad para pre-seleccionar a los aislamientos evaluados.



Fig. 18: Modelo de UE utilizado para desarrollar el ensayo, se observa el vaso, panojas y jaula de plástico con tul en la parte superior, colocadas sobre bandeja provista de agua para mantener la humedad.

3.2.1.2 Evaluación de la virulencia de la cepa seleccionada de *B. bassiana* en adultos de *O. poecilus*.

Sobre la cepa seleccionada del screening, se calculó CL₅₀ y CL₉₀ sobre adultos de *O. poecilus*, que permitieron determinar la virulencia de esta cepa. Para determinar estos parámetros, se realizó un ensayo Probit con 5 suspensiones (1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 conidios/ml) de esta cepa. Se realizaron 2 repeticiones de 10 insectos adultos cada uno, los cuales fueron sumergidos en las respectivas suspensiones durante 15 segundos y posteriormente colocados en cada UE. Después de la aplicación de los tratamientos, las UE fueron incubadas en cámara de crecimiento a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 10\%$ de HR y 14 horas de fotofase. Las evaluaciones de mortalidad fueron diarias y por un período de 15 días, los insectos muertos fueron llevados al laboratorio para confirmar la micosis a través de cámaras húmedas ($27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y en oscuridad).

Se estimaron los valores de CL₅₀ y CL₉₀ usando el análisis Probit, mediante el uso del software POLO-PC (Haddad, 1998) basado en el método de Finney (Finney, 1971).

3.2.1.3 Evaluación de la compatibilidad de la cepa seleccionada de *B. bassiana* con productos fitosanitarios para el cultivo de arroz.

Se evaluó la compatibilidad *in vitro* de la cepa seleccionada con productos fitosanitarios utilizados en el cultivo de arroz (Tabla 5).

Tabla 5: Productos fitosanitarios utilizados comúnmente en el cultivo de arroz y evaluados en bioensayo de compatibilidad sobre *Beauveria bassiana*.

Principios activos	Marca comercial	Categoría	Dosis recomendada
1) Glifosato (5400 ppm)	Round Up Full II® SL ¹	H	3 l/ha
2) Bispyribac sódico (3785 ppm)	Nominee 40® SC ¹	H	100 cm ³ /ha
3) Imazapic (1720 ppm) + Imazapyr 5250 ppm) + Coadyuvante	Kifix® WG ¹	H	210 g/ha + Coad. 250 g/ha
4) Thiametoxan (1410 ppm) + Lambdaialotrina (1060 ppm)	Engeo 247® SC ¹	I	300 cm ³ /ha
5) Betacyflutrin (900 ppm) + Imidacloprid (2100 ppm)	Solomon OD ¹	I	300 cm ³ /ha
6) Dinotefuran (7000 ppm)	Dinno WP ¹	I	85 g/ha

¹Formulaciones: SC=Suspensión Concentrada, SL=Concentrado Soluble, WG=Granulo Dispersable, WP=Polvo Mojable, OD=Dispersión Oleosa.

Producto fitosanitario: H=Herbicida, I=Insecticida

Las concentraciones finales de las suspensiones fueron ajustadas a 10%, 50%, 100%, y 200% de la dosis recomendada por el fabricante del producto (DR), siguiendo

la metodología de Lecuona et al., (2001). Se incorporaron 0,1 ml de la cepa seleccionada con una concentración de 5×10^7 conidios/ml a la suspensión para obtener un volumen final de la mezcla de 50 ml en frascos Erlenmeyer. Todos los tratamientos fueron comparados con un testigo representado por conidios agregados al agua sin ningún producto fitosanitario (0% DR). Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento, incluyendo el testigo. Las mezclas fueron agitadas de forma continua a 180 rpm, por 16 hs y a 26 °C (Figura 19).

Cada mezcla fue diluida en forma seriada hasta 10.000 veces y se sembraron 100 μ l en superficie sobre cajas de Petri con MC y posteriormente incubadas a 27 °C. Tres placas se sembraron por repetición. Las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron contadas 3 días más tardes (Figura 20). Los datos de UFC de cada tratamiento fueron comparados mediante ANOVA por medio del test de Duncan ($\alpha = 0,05$).



Fig. 19: Imagen del Shaker, proceso de agitado de los fitosanitarios y cepa de *Beauveria bassiana*.



Fig. 20: Procedimiento por el cual se efectuaban las diluciones en tubos de Enlarmeyers y luego se siembra en placas con MC para evaluar el recuento de viabilidad de conidios.

3.2.1.4 Evaluación del comportamiento de cepas Bb 301, Bb 63 de *B. bassiana* y Ma 50 de *M. anisopliae* a campo sobre adultos de *O. poecilus*.

Se evaluaron los controles de las cepas Bb 301, Bb 63 y Ma 50 sobre adultos de *O. poecilus* en condiciones de campo, las cuales fueran elegidas del screening por su desempeño en laboratorio, el valor de control y la observación visual de esporulación, siendo esta una característica necesaria para la generación de inóculo una vez aplicado en campo (Figura. 21).

Se prepararon suspensiones de conidios en Tween 80 (0,05%) a partir de los aislamientos crecidos en PDA (*M. anisopliae*) y MC (*B. bassiana*). Las suspensiones fueron ajustadas a 5×10^8 conidios/ml utilizando una cámara de Neubauer. El día antes de la realización del ensayo, los insectos fueron desinfectados superficialmente.

Las unidades experimentales (UE) constaron de un vaso de jaulas de plástico confeccionadas con botellas de gaseosa de 2 litros de capacidad, con perforaciones en los laterales, base y tapa (Figura 21a) lo cual permitió el intercambio gaseoso; en cada jaula se introdujeron 3 panojas principales del cultivo, y luego se cerró por la base la jaula para que los insectos no se escaparan.

En cada UE fueron colocados 10 adultos de *O. poecilus* obtenidos de la cría, las panojas seleccionadas fueron aplicadas con las suspensiones fúngicas mediante un atomizador de mano (4 gatilladas) lo cual asegura una cantidad de 4 ml/UE; el testigo se aplicó solo con solución de Tween 80 (0,05 %) y luego se introdujeron los insectos en cada UE. El diseño experimental fue en Bloques Completos al Azar, con 3 repeticiones, y dos sub-muestras cada una con 10 insectos.

El ensayo se llevó a cabo sobre cultivo de arroz, variedad Gurí INTA-CL en el campo experimental de la EEA INTA Concepción del Uruguay, teniendo como fecha de inicio el 05-03-2013 (Figura 21b). Se hicieron 4 evaluaciones de mortalidad (06-03, 07-03, 10-03 y 22-03 del 2013). Los insectos muertos fueron desinfectados superficialmente, colocados en cámara húmeda e incubados por 15 días a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ con 16 hs de fotofase, para confirmar la micosis. Los datos de mortalidad de cada tratamiento fueron comparados mediante ANOVA por medio del test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Las condiciones climáticas acontecidas durante el ensayo en la EEA Concepción del Uruguay se detallan en la (Tabla 6).

Tabla 6: Condiciones meteorológicas durante el ensayo a campo de control de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Oebalus poecilus*.

Fecha	T° media (°C)	Precipitación acumulada (mm)	Radiación acumulada ($\text{Mj}/\text{m}^2/\text{día}$)
05/03/2013	17,9	0	23,3
06/03/2013	21,3	0	50,0
07/03/2013	22,8	0	76,5
10/03/2013	22,2	10	139,4
22/03/2013	20,7	49,8	352,9



Fig. 21: a) Esquema de jaula (UE), b) Disposición de UE en ensayo a campo de control de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Oebalus poecilus*.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSION

3.3.1 Bioensayos

3.3.1.1 Ensayos de patogenicidad sobre adultos de *O. poecilus*.

Los resultados se muestran en la (Figura 22) donde se puede observar la gran variabilidad en los porcentajes de mortalidad, presentando valores mínimos de 20% (Bb 59) y máximos de 93,3% (Bb63).

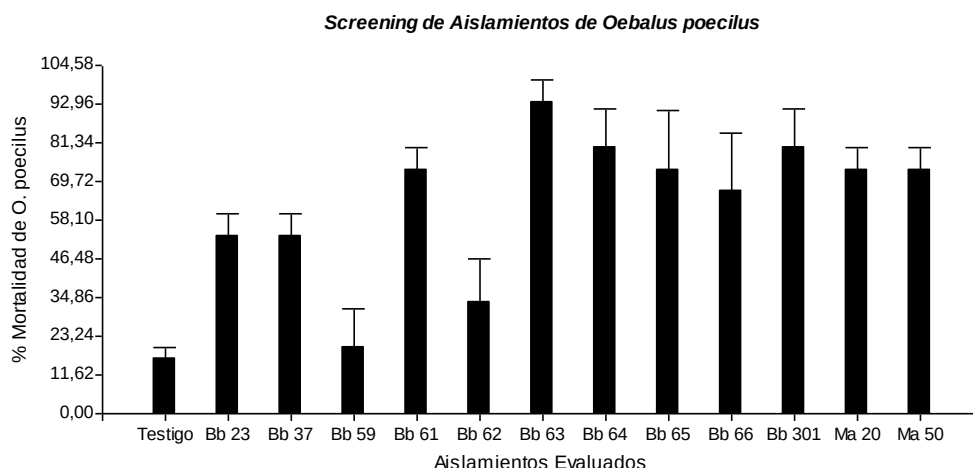


Fig. 22: Valores de mortalidad de los diferentes aislamientos evaluados sobre adultos de *Oebalus poecilus* para la selección de la cepa promisoría. Barras verticales indican el Error Estandar.

De las cepas evaluadas de *B. bassiana* (Bb), la mayoría presentó valores aceptables de control superando el 50%. Dos cepas, Bb59 y Bb62 fueron las que estuvieron por debajo de este valor y la que menor control presentó fue Bb59 no superando el 20% de control. Es importante analizar este bajo porcentaje, ya que esta cepa junto con las Bb 37, 61, 62, 63, 64, 65 y 66 son aislamientos de la zona de Oliveros (Santa Fe) y sobre el mismo hospedante (Tabla 4). Esto demuestra que las cepas no se comportan de la misma manera ante insectos diferentes, por más que sean de la misma familia o género. Esto es reportado por Gonzalez-Castillo et al., (2012) quienes mencionan que estos organismos presentan grados variables de especificidad. Hafez et al., (1994) señalan que los niveles de infección son el resultado del contacto entre el inóculo de una cepa virulenta y la susceptibilidad de la cutícula del insecto a la germinación, penetración del tubo germinativo y finalmente el desarrollo del patógeno en el cuerpo del insecto.

Los resultados de control para cada aislamiento pre-seleccionados fueron Bb61 (73,3%), Bb63 (93,3%), Bb64 (80%), Bb65 (73,3%) y Bb301 (80%). Resultados Rampoldi, Andrés

similares fueron obtenidos por otros autores, en una evaluación en laboratorio del aislamiento Bb353 de *B. bassiana* sobre *O. poecilus* indicaron que la dosis de $1,25 \times 10^9$ con/ml, causaron una tasa de mortalidad de 84,4% (Santos et al., 2001; Santos et al., 2002). Por otro lado, Santos et al., (2002) en un estudio con 5×10^7 con/ml sobre adultos de *O. poecilus* obtuvieron una mortalidad del 31,1%. En este punto, los resultados de esta tesis para estas cepas fueron evaluados a una concentración de 5×10^7 con/ml, lo cual demuestra un mayor control respecto al reportado por aquellos autores. Sin embargo, Santos et. al., 2006 reportan que la proporción de adultos hibernantes de *O. poecilus* infectados naturalmente con *B. bassiana* fue de 79.2% en 2000 y 60.2% en 2001. Si bien estos datos no son de laboratorio, se demuestra que valores del orden del 80% pueden ser logrados incluso a campo.

Dentro de las cepas evaluadas de *M. anisopliae* se destaca que su comportamiento en el control de *O. poecilus* fueron similares: 73,3%. En este sentido, Martins et al. (1987) observaron el efecto de *M. anisopliae* contra la chinche de la panoja en el campo, señalando que el aislado CP 172 en una concentración de 5×10^{13} esporas/ha demostró su eficacia en el control de *O. poecilus*, donde la reducción de la población de chinches fue de un 76,2%. Por otro lado, en su trabajo de tesis Reyes (2000) sobre adultos de *O. insularis* (Satl) menciona para una cepa de *M. anisopliae* a una dosis de 10^{12} con/ml, a los 11 días de la inoculación obtuvo una mortalidad cercana al 30%. Kruger (2014) reporta para otra chinche del arroz, *Tibraca limbativentris* (Hemiptero: Pentatomidae), controles del 100% en 10 días, a una concentración de 5×10^7 con/ml con la cepa Ma72. En este sentido, Martins et al., (2004) en laboratorio lograron obtener un 80% de control de adultos de *T. limbativentris* con *M. anisopliae*.

La Supervivencia Acumulada de las cepas que tuvieron mejor control de adultos de *O. poecilus* se detallan en la (Figura 23); los resultados obtenidos demuestran que las cepas evaluadas de *M. anisopliae* presentan valores aceptables de control, ambas logran el 70% de mortalidad en el día 11, valor que está por encima de lo obtenido por las cepas evaluadas de *B. bassiana*, Bb63, 64 y 301, las cuales obtuvieron esta mortalidad a los 8 días. La Vida Media o ST_{50} de los aislamientos se muestran en la (Tabla 7) donde se observa que para aislamientos de (Ma) presentaron los siguientes valores de ST_{50} : 7,53 para Ma20 y 6,93 para Ma50, valores similares a los observados para la mayoría de las pre-seleccionadas de *B. bassiana*. La Bb 301 presentó un ST_{50} de 5,91, siendo el menor valor de todo el ensayo, lo que demuestra la gran velocidad de control que presenta sobre este insecto.

Tabla 7: Cuadro resumen de los modelos utilizados y valores de Vida Media (ST_{50}) de las cepas que superaron el 50% del control en el screening sobre *Oebalus poecilus*.

Aislamiento	Modelo ($y = ax^2 + bx + c$)			Ajuste	ST_{50}	% Control
	a	B	C			
Bb 23	0,35 $p = <0,0001$	-9,38 $p = <0,0001$	107,33 $p = <0,0001$	$R^2 = 0,976$	9,65	53,33
Bb 37	0,23 $p = 0,0018$	-7,72 $p = <0,0001$	107,53 $p = <0,0001$	$R^2 = 0,963$	11,52	53,33
Bb 61	0,67 $p = 0,0023$	-17,17 $p = 0,0001$	132,62 $p = <0,0001$	$R^2 = 0,896$	6,44	73,33
Bb 63	0,49 $p = 0,0168$	-16,32 $p = 0,0001$	134,24 $p = <0,0001$	$R^2 = 0,930$	6,39	93,33
Bb 64	0,60 $p = 0,0005$	-16,97 $p = <0,0001$	130,74 $p = <0,0001$	$R^2 = 0,952$	6,06	80,00
Bb 65	0,43 $p = 0,0005$	-12,63 $p = <0,0001$	120,60 $p = <0,0001$	$R^2 = 0,961$	7,45	73,33
Bb 66	0,31 $p = 0,0246$	-11,03 $p = 0,0001$	123,38 $p = <0,0001$	$R^2 = 0,936$	8,87	66,67
Bb 301	0,72 $p = 0,0004$	-18,46 $p = <0,0001$	133,71 $p = <0,0001$	$R^2 = 0,930$	5,91	80,00
Ma 20	0,41 $p = 0,0008$	-12,80 $p = <0,0001$	123,18 $p = <0,0001$	$R^2 = 0,964$	7,53	73,33
Ma 50	0,22 $p = 0,0131$	-8,29 $p = <0,0001$	96,76 $p = <0,0001$	$R^2 = 0,956$	6,93	73,33

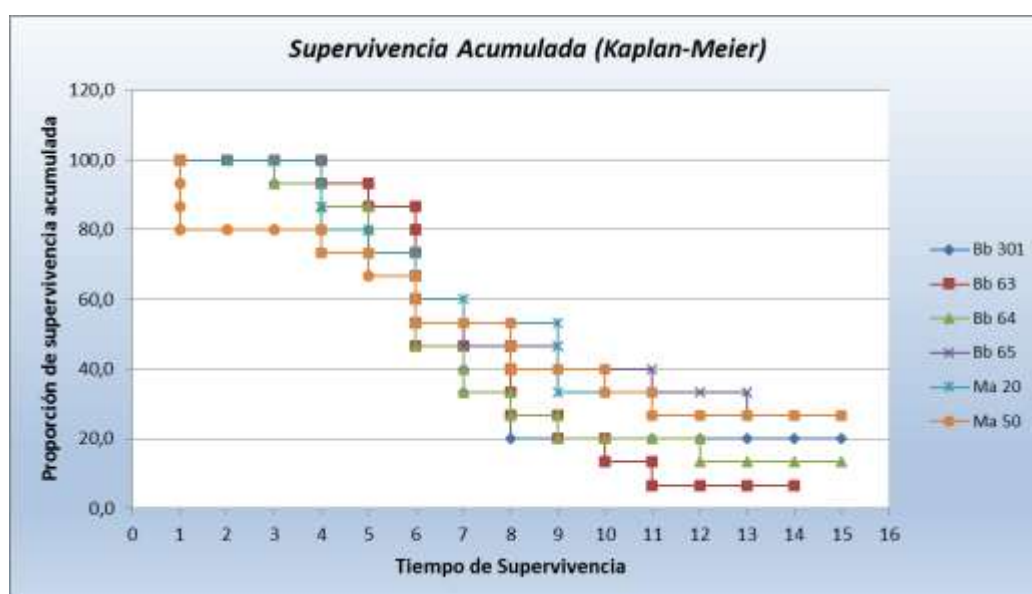


Fig. 23: Supervivencia Acumulada para las cepas pre-seleccionadas sobre el control de adultos de *Oebalus poecilus*.

Por lo descripto anteriormente, se seleccionó el aislamiento Bb301 para continuar con los siguientes ensayos de virulencia y compatibilidad; su alta velocidad de control, y su capacidad de generar gran producción de micelio y esporas sobre los insectos muertos infectados (apreciación visual), la transforman en una buena opción. Estos parámetros son de suma importancia, si entendemos el desarrollo del control microbiano como una herramienta complementaria para las existentes en la actualidad, es necesario que provoque una rápida mortalidad y genere la mayor fuente de inóculo posible para perdurar el efecto de control en el sitio aplicado.

3.3.1.2 Evaluación de la virulencia de la cepa Bb 301 de *B. bassiana* sobre adultos de *O. poecilus*.

El ensayo se condujo durante 15 días, el porcentaje máximo de mortalidad fue de 95% referido a la máxima concentración 1×10^9 conidios/ml. Los resultados de análisis Probit para la cepa Bb301 fueron: CL_{50} de $3,74 \times 10^7$ y CL_{90} de $6,13 \times 10^8$ los cuales se representan en la (Figura 24). Con un 95% de confianza, los valores de CL_{50} (LI = $1,20 \times 10^7$ c/ml y LS = $7,5 \times 10^7$ c/ml) y CL_{90} (LI = $2,69 \times 10^8$ c/ml y LS = $3,32 \times 10^9$ c/ml). La determinación de CL_{50} refleja la concentración necesaria para matar el 50% de los insectos, mostrando de esta manera la virulencia de esta cepa para los adultos de *O. poecilus* para este ensayo y bajo estas condiciones.

Los resultados obtenidos de CL_{50} ($3,74 \times 10^7$ c/ml) y CL_{90} ($6,13 \times 10^8$ c/ml) son relativamente bajos, lo que demuestra la gran virulencia y agresividad que presenta el aislamiento para el control de *O. poecilus*.

Es importante remarcar que para esta especie de chinche no se encontraron resultados de CL_{50} documentados, por tal motivo la discusión se efectúa con trabajos referidos al control de Hemípteros por medio de *B. bassiana*. Patel et al. (2006) mencionan valores de $0,42 \times 10^5$ y $1,93 \times 10^5$ con/ml CL_{50} de *B. bassiana* sobre *Oebalus pugnax* (Hemiptera: Pentatomidae). Por otro lado, Ihara et al., (2001) reportan resultados de CL_{50} en concentraciones de 10^6 a 10^8 para 8 aislamientos de *B. bassiana* sobre adultos de *Plautia stali* Scott. (Hemiptera: Pentatomidae). Sevím et al., (2013) mencionan valores de CL_{50} para *B. bassiana* de $5,51 \times 10^5$ y $3,96 \times 10^5$ con/ml para adultos y ninfas respectivamente de *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae). En otro trabajo, Hu et al., (1996) determinan una CL_{50} de *B. bassiana* de $1,1 \times 10^6$ con/ml para el control de *Riptortus linearis* (Hemiptera: Coreidae).

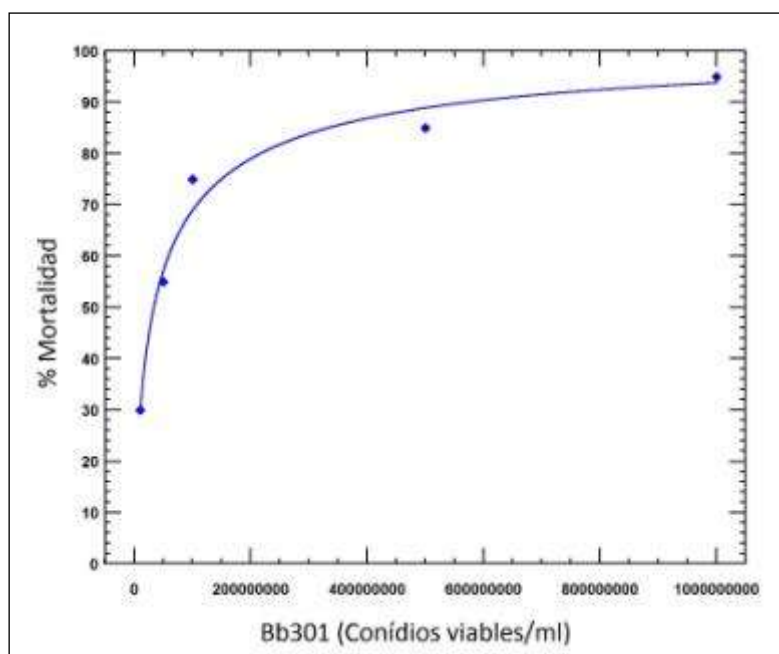


Fig. 24: Porcentaje de mortalidad de *Oebalus poecilus* para las concentraciones de Bb301 evaluadas en el ensayo.

3.3.1.3 Evaluación de la compatibilidad de cepa Bb 301 de *B. bassiana* con productos fitosanitarios.

Los resultados obtenidos de este ensayo fueron muy similares entre los diferentes productos fitosanitarios evaluados (Tabla 8).

Tabla 8: Recuentos de UFC por mililitro de la cepa Bb301 de *Beauveria bassiana* en mezcla con productos fitosanitarios usados comúnmente en cultivo de arroz en Entre Ríos

Productos Evaluados	Tratamientos					p-value	CV (%)
	0% DR (Control)	10% DR	50% DR	100% DR	200% DR		
Round Up Full II® SL ¹	547,6 x 10 ⁵ B	497 x 10 ⁵ B	382,3 x 10 ⁵ A	384,6 x 10 ⁵ A	382 x 10 ⁵ A	< 0,001	7,73
Nominee 40® SC ¹	3123,3 x 10 ⁵ BC	3280 x 10 ⁵ C	3100 x 10 ⁵ BC	3050 x 10 ⁵ AB	2840 x 10 ⁵ A	0,013	3,81
Kifix® WG ¹	569,3 x 10 ⁵ B	547,3 x 10 ⁵ B	343,3 x 10 ⁵ A	315 x 10 ⁵ A	312,7 x 10 ⁵ A	0,002	17,95
Engeo 247® SC ¹	1033,3 x 10 ⁵ AB	1093,3 x 10 ⁵ B	1040 x 10 ⁵ AB	1040 x 10 ⁵ AB	987,3 x 10 ⁵ A	0,042	3,26
Solomon O-TEQ OD ¹	5,10 x 10 ⁵ B	5,1 x 10 ⁵ B	5,1 x 10 ⁵ B	4,9 x 10 ⁵ B	4,5 x 10 ⁵ A	0,022	3,85
Dinno WP ¹	506,6 x 10 ⁵ B	465 x 10 ⁵ A	438 x 10 ⁵ A	446,5 x 10 ⁵ A	440,6 x 10 ⁵ A	0,006	4,14

DR: Dosis recomendada del producto por fabricante.

* **Para un mismo producto:** medias seguidas por la misma letra en la misma fila no difieren estadísticamente ($P < 0,05$, Test de Duncan).

La viabilidad del aislamiento Bb 301 con productos fitosanitarios de uso más frecuente en el cultivo de arroz, se vio poco afectada. Dentro del grupo de productos químico herbicidas evaluados, Round Up Full II® SL (Glifosato 66,2 % i.a.) y Kifix® WG (Imazapic 17,2 % + Imazapyr 52,5 % i.a.) fueron los que mayor efecto inhibitorio tuvieron, presentando en su DR 50% una reducción de viabilidad del 30,2% y 39,7%, en la DR 100% un 29,7% y 44,7%, por último en la máxima DR 200% presentaron valores del 30,2% y 45,1% respectivamente para cada DR y producto. Por otro lado, se destaca que el producto Nominee 40® SC (Bispiribac Sodio 40 % i. a.) no afectó la viabilidad de la cepa Bb 301, reportando un valor de reducción de viabilidad en su máxima DR 200% de 9% (Figura 25).

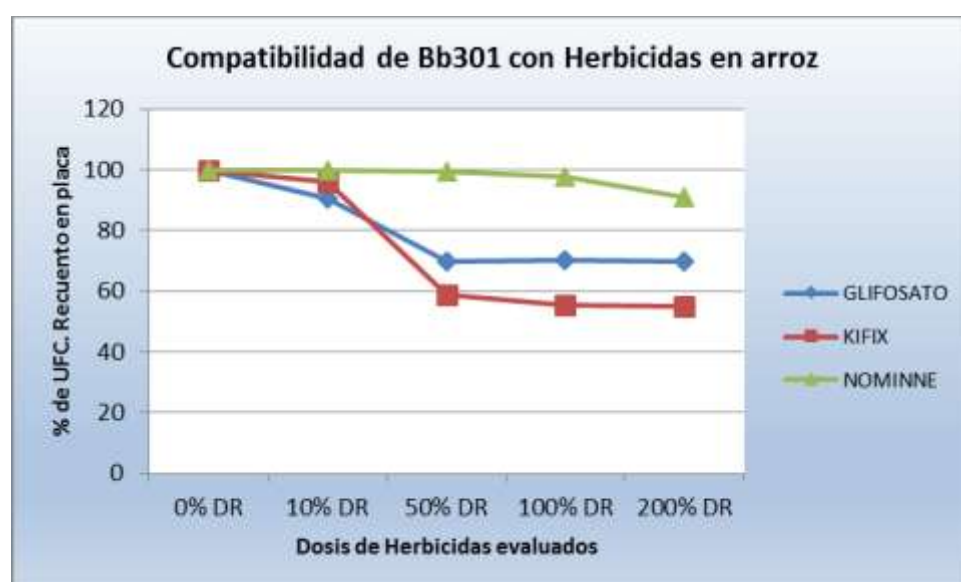


Fig. 25: Resultados de mezcla de cepa Bb 301 con productos herbicidas utilizados en cultivo de arroz en Entre Ríos.

Fregonesi et al., (2016) reportan que los principios activos Diuron, Metribuzin, Imazapir y Glifosato perjudicaron la germinación, crecimiento y esporulación de 3 cepas de *B. bassiana*. Por otro lado, Botelho y Monteiro (2011) mencionan reducciones en el crecimiento y esporulación de *B. bassiana* para Glifosato e Imazetapir de 40-60% y 6-68% respectivamente para cada principio activo. Este último principio activo pertenece al grupo químico de los Inhibidores de la Aceto-lactato Sintetasa (ALS), los cuales inhiben la síntesis de aminoácidos y por consiguiente la división celular. Tal mecanismo puede afectar el metabolismo de este hongo y de esa manera reducir sus parámetros biológico, especialmente en altas dosis (Botelho y Monteiro 2011).

La combinación del aislamiento Bb 301 con productos químicos insecticidas más utilizados en el cultivo de arroz presentó comportamientos dispares. De los tres principios activos evaluados, los productos Engeo 247® SC y Solomon O-TEQ OD no presentaron reducción en la viabilidad de este aislamiento, mostrando en su máximo valor de DR 200% una reducción de 4,5% y 11,7% respectivamente. El producto comercial Dinno WP es el que más afectó la viabilidad. Para la DR 10% reduce un 8,2%, para el DR 50% un 13,5%, no habiendo variado esta reducción hasta la DR 200% (Figura 26).

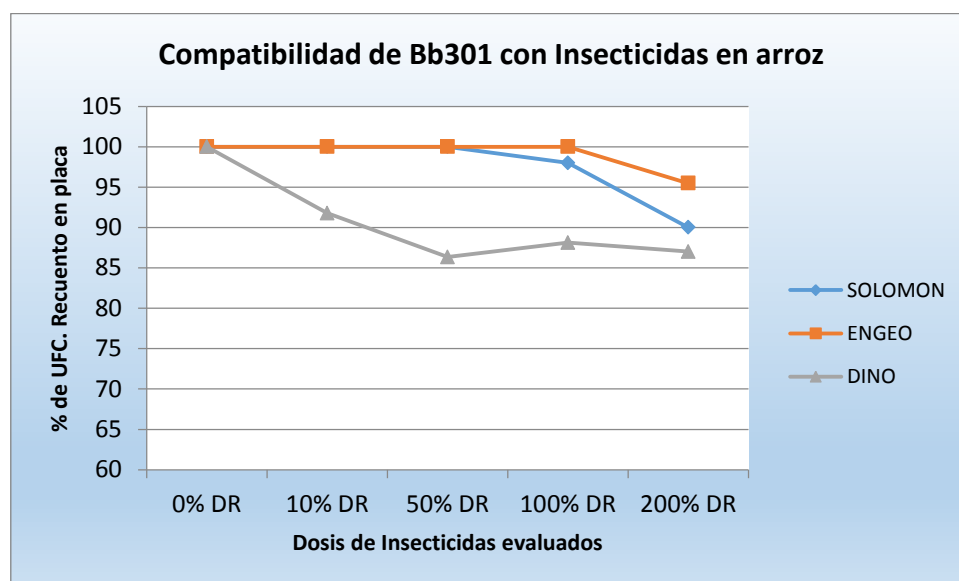


Fig. 26: Resultados de mezcla de cepa Bb 301 con productos insecticidas utilizados en cultivo de arroz en Entre Ríos

Fregonesi et al., (2016) reportan para insecticidas Thiametoxan y Fipronil una reducción promedio de germinación y crecimiento en mezcla con cepas de *B. bassiana* de 80-34% y 9-30% respectivamente para cada principio activo y parámetro. En otro trabajo, Nussenbaum (2014) menciona que los insecticidas Zetametrina y Beta-Cipermetrina, fueron menos tóxicos a bajas dosis para todos los aislamientos de *B. bassiana*, pero a altas dosis fueron incompatibles para este hongo.

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

3.3.1.4 Evaluación del comportamiento de la cepa Bb 301 y Bb 63 de *B. bassiana* y Ma 50 de *M. anisopliae* a campo sobre adultos de *O. poecilus*.

Se observó una variabilidad en los valores de control para las diferentes cepas evaluadas ($F=22,9$; $Gl=4$; $R^2=0,96$; $P=0,0051$) (Tabla 9). De las cepas evaluadas de *B. bassiana*, Bb 301 (Figura 27) logró un control del 43%, seguida por Bb 63 con un total de 15% y por último Ma 50 cepa de *M. anisopliae* logró un control del 10% sobre adultos de *O. poecilus* (Tabla 9). Según Silva y Veiga (1998), un entomopatógeno es considerado eficaz cuando presenta una mortalidad superior al 40 %. Este resultado entonces representa un muy buen valor de control, pensando que este ensayo fue llevado a cabo solamente con la cepa en grado puro sin formular, es decir sin protectores UV ni otros coadyugantes para prevenir desecación y mejorar la adhesión. Martins et al., (2004), llevaron a cabo tres experimentos en Rosario do Sul (RS, Brasil), evaluando la eficiencia de *M. anisopliae* en el control de *T. limbativentris*, con la pulverización de una suspensión de $7,2 \times 10^{13}$ conidios/ha y observaron un control del 61,8 % a los 45 días de aplicado en el experimento 1, un 48,2 % y 39,5 % a los 15 días de aplicado en el experimento 2 y 3, respectivamente, pero de estos últimos sólo se confirmaron la mortalidad por micosis el 20 % y el 9,8 %. En este sentido, Santos et al., (2003) reportan que el aislado Bb353 de *B. bassiana* aplicado en un área con hojas de bambú (el sitio de hibernación de *O. poecilus*) a una concentración de 10^{13} conidios/ha, no causó mortalidad en la población hibernante del insecto.

Tabla 9: Valores de control de las diferentes cepas evaluadas sobre adultos de *Oebalus poecilus* en ensayo a campo año 2013.

Aislamiento evaluado	Total de insectos	Muertos confirmados	% de control
Bb 301	60	26	43 B
Bb 63	60	9	15 A
Ma 50	60	6	10 A
TESTIGO	60	4	6,6 A
CV			51,19
<i>p-value</i>			0,0051

* Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente ($P < 0,05$, Test de Tukey).



Fig. 27: Imagen de Bb 301 luego de la incubación de adultos de *Oebalus poecilus* recolectados muertos del ensayo a campo en el año 2013.

Los resultados obtenidos en este capítulo nos permiten determinar que es factible el desarrollo del control microbiano de *O. poecilus* por medio de HE, siendo la cepa Bb301 la elegida definitivamente por su comportamiento ante este insecto tanto en laboratorio como a campo, presentado compatibilidad con la mayoría de los productos fitosanitarios usados con mayor frecuencia en los lotes arroceros de Entre Ríos, lo que permite pensar en su rápida y fácil adopción.

CAPÍTULO 4

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

La chinche de la panoja del arroz, *O. poecilus*, ha pasado a ser una de las plagas más importantes en la provincia de Entre Ríos a partir de la reestructuración y concentración del cultivo en la zona centro-norte de la provincia. Las tecnologías de proceso de cultivo como siembra directa, utilización de mayor cantidad y disponibilidad de fertilizantes, secuencias de cultivos consecutivos de arroz-arroz y la micro-región (zona de pastizales naturales, montes nativos y embalses para riego), favorecieron el desarrollo de organismos perjudiciales para el cultivo, dentro de los cuales, esta chinche es la que se adaptó con mayor rapidez a estos cambios y condiciones propicias para su desarrollo.

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es una estrategia que promulga el control de organismos perjudiciales mediante el uso de todas las tácticas compatibles disponibles, con el objetivo de reducir su impacto negativo y favorecer el desarrollo sustentable de la producción. Dentro de estas herramientas de manejo, los organismos de biocontrol han sido reportados en numerables ocasiones; pero su desarrollo, si bien en los últimos años ha tomado mayor importancia, está muy por debajo de su potencial. El éxito del control microbiano de insectos por medio de hongos entomopatógenos (HE) se basa en la obtención de cepas nativas, las cuales deben ser evaluadas en diferentes condiciones y contra variados artrópodos plagas, lo cual requiere un continuo y prolongado desarrollo y búsqueda para lograr obtener un bioplaguicida.

En la fig. 28 y 29 se detallan los pasos seguidos en este estudio para el desarrollo del control microbiano de *O. poecilus* en cultivo de arroz.

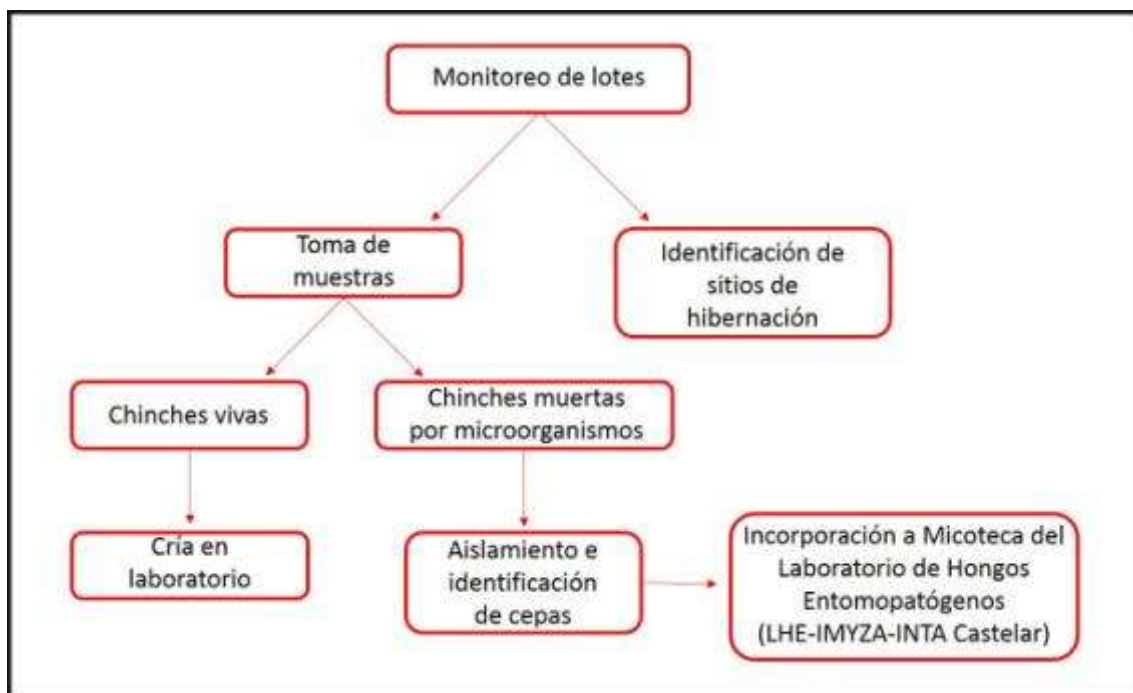


Fig. 28: Secuencia de pasos seguidos para la recolección, cría de insectos y aislamiento e identificación de cepas nativas de Hongos Entomopatógenos.

El hecho de haber encontrado HE sobre cadáveres de *O. poecilus* motiva a pensar que un agente de biocontrol a nivel de campo prolongado en el tiempo es factible para iniciar estudios con miras al desarrollo de un bioinsecticida. En total se lograron aislar e identificar 3 cepas de HE las cuales fueron introducidas en la Micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del IMIZA-INTA Castelar. Se pudo observar y constatar que *O. poecilus* pasa el invierno en estado adulto hibernante, teniendo poca o nula movilidad del sitio de refugio (preferencia demostrada por especies de la familia Poaceae); dicha chinche se posiciona lo más próximo posible al lote de arroz durante esta etapa del año, generando esto una fuente de reserva de insectos y una amenaza latente para la futura campaña.

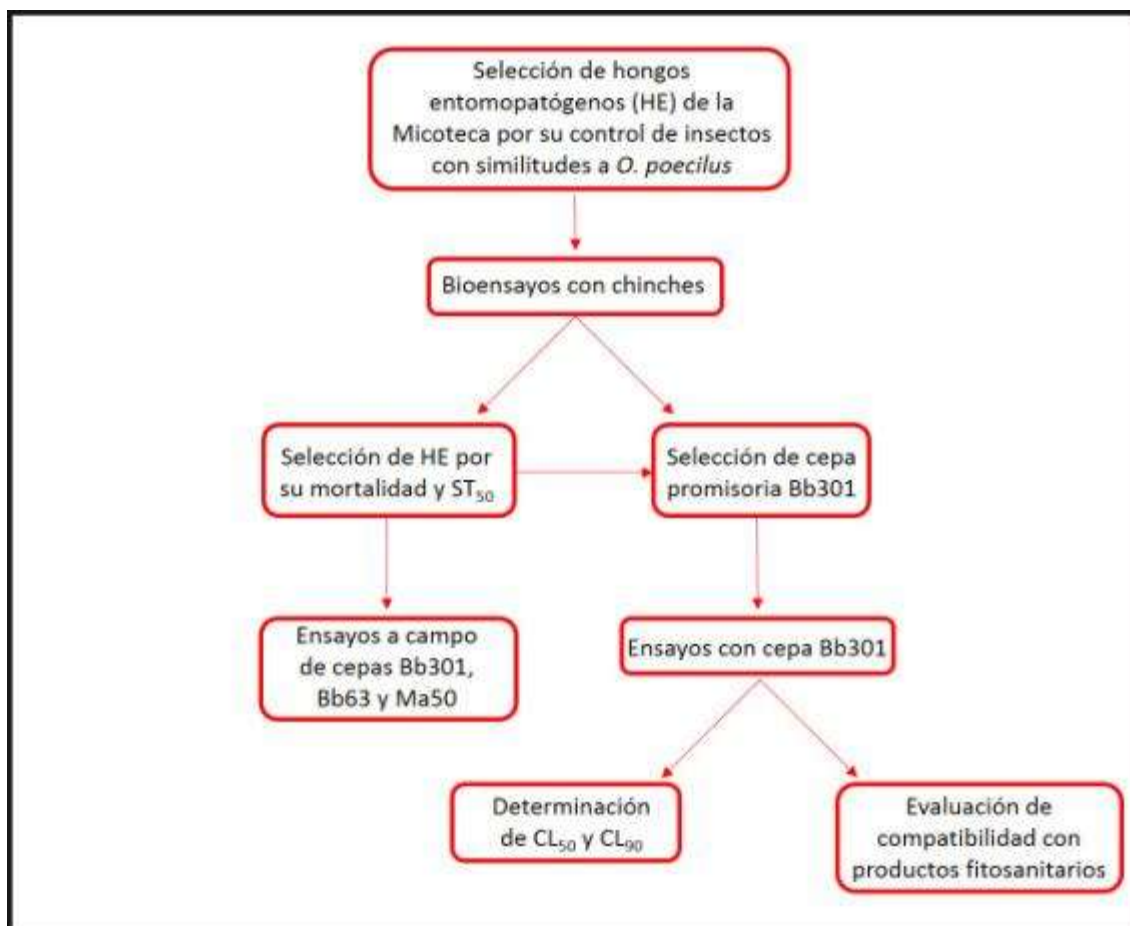


Fig. 29: Esquema de Bioensayos realizados con chinches y selección de Hongo Entomopatógeno Bb301 como promisorio para el control de adultos de *Oebalus poecilus*.

Se pudo determinar el Tiempo de Supervivencia Media (ST₅₀) de aquellas cepas que superaron el 50% de mortalidad. Estos resultados demuestran el gran potencial y velocidad de control que presenta la cepa Bb 301 (5,91 días), siendo esta característica de gran importancia ya que siempre se presenta a los HE con la característica negativa de baja velocidad de control en comparación con el elevado poder de volteo de los insecticidas químicos. En este caso, hay que tener en cuenta que la velocidad de control y persistencia del aislamiento nativo seleccionado en campo, transforman esta alternativa como una gran oportunidad en el manejo sustentable de plagas en lotes arroceros.

Los resultados de la compatibilidad *in-vitro* de este aislamiento con diferentes productos fitosanitarios utilizados en el cultivo de arroz, permite mencionar que Bb 301 es compatible con la mayoría de los productos evaluados. Esto refleja una gran oportunidad de introducir este entomopatógeno en aplicaciones de lotes arroceros y zonas cercanas, permitiendo aumentar la presión de inóculo y reducir la presencia de la

chinche en el cultivo; como así también permitir que esta técnica de manejo de plagas pueda adoptarse de manera rápida y segura por parte de los productores, no siendo necesaria una aplicación exclusiva con el entomopatógeno.

El ensayo realizado a campo demuestra que en condiciones naturales, sin haber usado protectores y/o coadyuvantes en los preparados biológicos, nuevamente la cepa Bb 301 se destaca sobre las demás, logrando valores de control del 40%, corroborando lo observado en laboratorio y afirmando la selección como aislamiento promisorio para el control microbiano sobre adultos de *O. poecilus* dentro de programas de manejo sustentable, buenas prácticas agrícolas y aplicando el MIP sobre el cultivo.

Por los resultados obtenidos se selecciona a la cepa Bb301 como promisorio para el control de adultos de *O. poecilus* en lotes arroceros, sirviendo como base para futuros estudios para el desarrollo de bioinsecticidas para uso comercial.

4.2 CONCLUSIONES

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

Hipótesis 1: Se esperaba que los aislamientos de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sean efectivos y puedan ser utilizados para el control microbiano de *O. poecilus*. En este sentido, se pudo corroborar que aislamientos de ambos HE fueron efectivos sobre este artrópodo. Se determinó que Bb 301 es la cepa que mejor desempeño presentó en todas las evaluaciones realizadas, convirtiéndola en la cepa seleccionada para el desarrollo futuro de un micoinsecticida para el control microbiano de *O. poecilus*.

Hipótesis 2: Se pudo demostrar que es posible utilizar esta cepa Bb 301 en combinación con productos fitosanitarios de síntesis química en el plan de MIP del cultivo en aplicaciones conjuntas con el fin de reducir el daño y mejorar el control de *O. poecilus*.

4.3 NUEVAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN

A futuro se evaluarán distintas formulaciones de micoinsecticidas, con el objetivo de mejorar el desempeño a campo de estos HE y poder desarrollar un producto biológico de calidad y eficiente para el control de *O. poecilus*.

Se establecerán umbrales de acción para *O. poecilus* teniendo en cuenta la falta de información actual y en conjunto con el desarrollo de productos biológicos.

Se pretende evaluar la patogenicidad de Bb 301 y otras cepas nativas sobre el complejo de plagas en el cultivo de arroz en la Provincia de Entre Ríos.

Se incluirán estos microorganismos ya seleccionados como parte de un programa de MIP para el cultivo del arroz en proyectos de la EEA-INTA Concepción del Uruguay.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, G.S.; 1989. Ecologia de populações, biologia e estratégias da história de vida de *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae). Dissertação (Ecologia), UFRGS, Porto Alegre, RS, p. 309.
- Albuquerque, G.S.; 1991. Primeiro registro de ocorrência de *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) na cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). An. Soc. Entomol. Brasil, 20: p. 219-220.
- Albuquerque, G.S.; 1993. Planting time as a tactic to manage the small rice stink bug, *Oebalus poecilus* (Hemiptera, Pentatomidae), in Rio Grande do Sul, Brazil. Crop Protection, v.12, p. 627-630.
- Al-Maza, M.S.; Ship, L.B.; Roadbent, B.; Kevan, P.; 2006. Biological control of *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) and *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) vectored *Beauveria bassiana* in greenhouse sweet pepper. Biological Control, 37: p. 89-97.
- Alves, S.B.; 1986. Agentes entomopatogênicos no controle microbiano. Pp. 73-126 en Alves, S.B. (Coord.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Manole.
- Alves, S.B.; 1998. Controle microbiano de insetos. 2 ed., FEALQ: Piracicaba. p.1163.
- Alves, S.B.; Lopes, R.B.; Vieira, S.A.; Tamai, M.A.; 2008. Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América latina. p. 69-110 en Alves, S.B. y Lopes, R.B. Controle microbiano de pragas na América Latina. Piracicaba, Fealq, p. 414.
- Amaral, S.F.; 1949. Biologia e importância do percevejo do arroz no Estado de São Paulo. Biológico, 15(3): p. 47-58.
- Antonioli, Z.I.; 1988. Natureza do pecky rice do arroz parbolizado no Rio Grande do Sul. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Asaff, A.; García-Rojas, C.C.; Viniegra-González, G., De la Torre, M.; 2006. Carbon distribution and redirection of metabolism in P.

fumosoroseus during solid-state and liquid fermentations. *Process Biochem.* 41: p. 1303-1310.

- Asaff, T.A.; Reyes, V.Y.; Lopez, L. V.E.; De la Torre, M.M.; 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva.* México 21: p. 291-295.
- Asociación Correntina de Plantadores de Arroz (ACPA); 2015. <http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar/Paginas/la.produccion.de.arroz.en.argentina>.
- Barranco, F.E.; Alatorre, R.R.; Gutiérrez, R.M.; Viniegra, G.G.; Saucedo, C.G.; 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enz. Microb. Technol.* 30: p. 910-915.
- Batista, F.A.; Almeida, J.E.M.; Lamas, C.; 2001. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, Londrina, v.30, p.437-447.
- Baverstock, J.; Roy, H.; Clark, S.; Alderson, P.G.; Pell, J.K.; 2006. Effect of fungal infection on the reproductive potential of aphids and their progeny. *Journal of Invertebrate Pathology.* 91: p. 136-139.
- Bazán, T.M.; 2002. Efecto de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado. Tecoman, Colima. p. 9.
- Beck, S.D., 1980. *Insect photoperiodism.* 2. ed. Academic Press, New York, p.387.
- Becker, M.; Martins, F.J.M.; Albuquerque, G.S.; 1989. Incidência de parasitismo por taquinídeos (Diptera: Tachinidae) em populações de *Oebalus poecilus* (Hemiptera: Pentatomidae) durante o ano. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 12., 1989, Belo Horizonte. Resumos. Belo Horizonte: SEB, 1989. p.185.
- Bentancourt, C.M. y Scatoni, I.B.; 2010. Guía de Insectos y Ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay; Tercera edición. Universidad de la República, Fac. de Agronomía, Montevideo, 2010. (<http://laguiasata.com/>).
- Beringer, J. da S.; Zimmer, S.; Oliveira, J.V.; Castilhosfortes, R.; 2007. Efeito de *Aspergillus flavus* sobre *Oebalus poecilus* (Hemiptera:

Pentatomidae). In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 5., Pelotas. Anais. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007a. p. 73-74.

- Bernhardt, J.L.; 2009. Control of Rice Stink Bugs with Foliar Application of Dinotefuran and Clothianidin. B.R. Wells Rice Research Studies 2009. p. 90-94.
- Bidochka, M.J.; Kasperski, J.E.; Wild, G.A.M.; 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. Can. J. Bot. 76, p. 1198-1204.
- Bidochka, M.; Khachatourians, G.; 1991. The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. J. Invert. Pathol. 58: p. 106-117.
- Botelho, A.A.A. y Monteiro, A.C.; 2011. Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar.

Bragantia, Campinas, v. 70, n. 2, p. 361-369

- Brady, N. y Weil, R.; 1996. Soils and chemical pollution. Chapter 18 of book The Nature and Properties of Soils. Prentiss Hall Intnal.
- Bullock, J.A.; 1967. The arthropoda of tropical soils and leaf litter. Trop. Ecol. 8: p. 74-87.
- Burges, H.D.; 1998. Formulation of Microbial Pesticides. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bustillo, A.; 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. In: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá, p. 30-53.
- Butt, T.M. y Copping, L.; 2000. Fungal biological control agents. Pesticide Outlook 11, p. 186-191.
- Camargo, L.M. F.; 2000. Efectividad biológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (Metsch) para el control del gorgojo del frijol, *Acanthoscelides obtectus* (Say). Tesis Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Instituto de enseñanza e investigación en Ciencias agrícolas. Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. p. 63.

- Carneiro, R.M.D.G.; Almeida, M.R.A.; Martins, I.; Souza, J.F.; Pires, A.Q. y Tigano, M.S.; 2008. Ocorrência de *Meloidogyne spp.* e Fungos Nematófagos em Hortaliças no Distrito Federal, Brasil. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba (SP) Brasil. Vol. 32(2) – 2008. p. 135-141.
- Carruthers, I.R. y Hural, K.; 1990. Fungi as natural occurring entomopathogens. En Baker RR, Dunn PE (Eds.) *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Liss. Nueva York, EEUU. p. 115-138.
- Castillo, Z.S.; 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia ssp.* y *Prosapia ssp.*) en pastizales de *Brachiaria decumbrens* en el Petén, Guatemala. p. 17 y 18.
- Cerejeira, M.J.; Viana, P.; Batista, S.; Pereira, T.; Silva, E.; Vale'rio, M.J.; Silva, A.; Ferreira, M.; Silva-Fernandes, A.M.; 2003. Pesticides in Portuguese surface and groundwaters. *Water Res* 37: p. 1055–1063. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00462-6.
- Charnley, A.K.; 1992. Mechanism of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer, C.J., C. Prior (eds.), *Biological control of locusts and grasshoppers*. Melkshan, UK: CAB International. p. 191-190.
- Charnley, A.K.; 1997. Entomopathogenic Fungi and their role in pest control. En Wicklow D, Soderstrom M (Eds.) *The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships*. Springer. Heidelberg, Alemania. p. 185-201.
- Chaves, G.S.; Ferreira, E.; Garcia, A.H.; 2001. Influência da alimentação de *Oebalus poecilus* (Heteroptera: Pentatomidae) na emergência de plântulas em genótipos de arroz (*Oryza sativa*) irrigado. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 31(1): p. 79-85.
- Chi, V.T.B (2005). Economic performance by using bio-insecticides and chemical insecticides to control rice insect pests. *Omonrice* 13: p. 63-68.
- Clavijo, S.A., 1992. *Fundamentos del Manejo de Plagas*. Universidad Central de Venezuela ISBN: 978-980-00-0612-2.
- Costa Lima, A.; 1940. *Insetos do Brasil. Hemípteros*. 2º Tomo. Rio de Janeiro. Escola Nacional de Agronomia. 351 p. (Série didática 3).

- Cova, L.J. y Scorza, J.V.; 2006. Control temporal de moscas caseras (*Musca domestica*) en galpones avícolas mediante nebulizaciones con conidias de *Beauveria bassiana*. Bol. Malariol. Salud Amb. XLVI (2): p. 137- 142
- Cova, L.J.; Scorza, J.V.; García, D.E.; Cañizales, L.M.; Guedez, C.C.; Maffey, M. y Medina, M.G.; 2009. Control temporal de moscas caseras (*Musca domestica*) en galpones avícolas mediante nebulizaciones con conidias de *Beauveria brongniartii*. Zootecnia Trop.
- Danks, H.V.; 1978. Modes of seasonal adaptation in insects – I- winter survival. Can Entomol 110: p. 1167-1205.
- Deshpande, M.V.; 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. Crit. Rev. Microbiol. 25: p. 229-243.
- Devi, K.U.; Sridevi, V.; Murali Mohan, C.; Padmavathi, J.; 2005. Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. Journal of Invertebrate Pathology. 88: p. 181-189.
- Díaz, M.P.; Macías, A.F.; Navarro, S.R.; De la Torre, M.; 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia, vol. 31, número 012. p. 856-860.
- Doberski, J.W.; 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology, v. 37, n. 2, p. 195-200.
- Eilenberg, J.; Hajek, A.; Lomer, C.; 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl 46: p. 387-400.
- Ekesi, S.; 2001. Pathogenicity and antifeedant activity of entomopathogenic hyphomycetes to the cowpea leaf beetle, *Ootheca mutabilis* Shalberg. Insect Science Application. 21: p. 55-60.
- Empresa Brasileira de Investigación Agropecuária (Embrapa); 2008. Manejo do Percevejo da Panícula em Arroz Irrigado. Circular Técnica N° 79. ISSN 1678-9636.
- España, L.M.P.; 2000. Caracterización enzimática de aislados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), y su virulencia sobre

Epilachna varivesti (Coleptera: coccinellidae). Universidad de Colima, Tecmán, Colima.

- Faria, M.R. y Wraight, S.P.; 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43: p. 237-256.
- Feng, M.G.; Poprawski, T.J.; Khachatourians, G.G.; 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* for insect control. *Curr Status Rev Biocontrol Sci Technol* 4: p. 3-34.
- Ferreíra, E.; 1980. Efeitos da integração de meios de controle sobre os insetos do arroz de sequeiro. Ph.D. dissertation, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brazil. 129 pp.
- Ferreira, E.; 1998 a. Manual de identificação de pragas do arroz. Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, GO. 110 p.
- Ferreira, E.; 1998 b. Insetos prejudiciais ao arroz e seu controle, p.125-6. In Breseghello, F. & L.F. Stone (Eds.). *Tecnologia para o arroz de terras altas*. Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, GO. 161 p.
- Ferreira, E.; 1999. Pragas e seu controle, p. 197-209. In Vieira N.R., A.B. Santos & E.P.Sant'Ana (Eds.). *A cultura do arroz no Brasil*. Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, GO. 633 p.
- Ferreira, E. y Barrigossi, J.A.F.; 2006. Produção e qualidade do grão do arroz irrigado infestado por adultos de percevejo-das-panículas. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.41, n.7, p. 1083-1091.
- Ferreira, E.; Barrigossi, J.A.F.; Vieira, N.R. de A.; 2001. Percevejos das panículas do arroz: fauna heteroptera associada ao arroz. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 27 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular técnica, 43).
- Ferreira, E. y Martins, J.F. da S.; 1984. Insetos prejudiciais ao arroz no Brasil e seu controle. Goiânia: Embrapa-CNPAP. Documentos 11. 67p.
- Ferreira, E.; Vieira, N.R. de A.; Rangel, P.H.N.; 2002. Avaliação dos danos de *Oebalus spp.* em genótipos de arroz irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 37, n. 6, p. 763-768.

- Ferron, P.; 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metharhizium*. p. 67-78 en Burges, H.D. Ed. Microbial control of pest and plant diseases. London, Academic press.
- Finney, D.; 1971. Probit Analyses. Cambridge University Press, Cambridge. p.333.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 2004. Año Internacional del Arroz. [en línea] http://www.fao.org/rice2004/es/index_es.htm.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 2013. The state of food and agriculture. Rome. E-ISBN 978-92-5-107672-9 (PDF).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 2015. Sección: Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura dirección de estadística (FAOSTAT) <http://faostat3.fao.org>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 2016. seguimiento del mercado del arroz / abril de 2016. <http://www.fao.org/economic/est/publications/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/>
- France, A.; Gerding, M.; Sandoval, A.; 2002. Pathogenicity of Chilean isolates of *Beauveria bassiana* to adults of *Asynonychus cervinus* (Coleoptera: Curculionidae). Agricultura Técnica, INEA. 62: p. 489-96.
- Franco, K.; Rodríguez, S.; Cervantes, J.; Barranco, J.; 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. Sociedades rurales, producción y medio ambiente año 2011 vol.11 núm 22.
- Fregonesi, A.F.; Mochi, D.A.; Monteiro, A.C.; 2016. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* a inseticidas, herbicidas e maturadores em condições de laboratorio. Arq. Inst. Biol., v.83, 1-8, e0242014.
- Freimoser, F.M.; Grundschober, A.; Tuor, U.; Aebi, M.; 2003. Regulation of hyphal growth and sporulation of the insect pathogenic fungus *Entomophthora thripidum* in vitro. FEMS Microbiology Letters 222: p. 281-287.
- Fuguet, R.; Théraud, M.; Vey, A.; 2004. Production in vitro of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a

chitosanase-like protein secreted by a melanizing isolate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 138: p. 149-161.

- Fuguet, R. y Vey, A.; 2004. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria spp.* in vivo studies. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: p. 152-167.
- Fujino, K. y Sekiguchi, H.; 2011. Origins of functional nucleotide polymorphisms in a major quantitative trait locus, qLTG3-1, controlling low-temperature germinability in rice. *Plant Molecular Biology*. 75: p. 1–10.
- Fundación PROARROZ; 2010. <http://proarroz.com.ar/>
- Gallo, D. (in memoriam); Nakano, O.; Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C.; Berti filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S. y Omoto, C.; 2002. *Entomologia agrícola*. FEALQ, Piracicaba, p. 920.
- Garbelotto, T.A.; 2008. Pentatominae (Heteroptera, Pentatomidae) no sul de santa catarina. Trabajo de graduación. Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. p35-36.
- Garcia, R., Caltagirone, L.E. y Gutierrez, A.P.; 1988. Comments on a redefinition of biological control. *BioScience* 38: p. 692-694.
- Garcia Gutiérrez, C. y González Maldonado, M.B.; 2010. Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. *Ra Ximhai*, v. 6, n. 1, p. 17-22.
- Gillespie, A.T.; 1988. The use of entomogenous fungi for pest control and role of toxins in pathogenesis. *Pest. Sci.* 27: p. 203-215.
- Gillespie, A.T. y Claydon, N.; 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Sci.* 27: p. 203-215.
- Goettel, M.S.; Eilenberg, J.; Glare, T.R.; 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S, eds. Elsevier: *Comprehensive Molecular Insect Science*. 6: p. 361– 406.
- Golshan, H.; Saber, M.; Majidi-Shilsar, F.; Bagheri, M.; Mahdavi, V.; 2013. Effects of Common Pesticides Used in Rice Fields on the Conidial Germination of Several Isolates of Entomopathogenic Fungus, *Beauveria*

bassiana (Balsamo) Vuillemin. J. Entomol. Res. Soc., 15(1): p. 17-2. ISSN: 1302-0250.

- González-Castillo, M.; Aguilar, C.N.; Rodríguez-Herrera, R.; 2012. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatogenos: Retos y perspectivas. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. Volumen 4, No. 8. p. 42-55.
- Greathead, D. J. y Waage, J. K.; 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. The World Bank, Washington, D.C., World Bank Technical Paper Number 11. 44 p.
- Greve, C.; Fortes, N.D.F.; Grazia, J.; 2003. Estágios imaturos de *Oebalus poecilus* (heteroptera, pentatomidae) Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 93(1): p. 89-96.
- Haddad, M.L. 1998. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. Pp.999-1013 en Alves, S.B. (ed). Controle microbiano de insetos. Fealq, Piracicaba, Brasil.
- Hafez, M.; Zaki, F.N.; Moursy, A.; Sabbour, M.; 1994. Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the Potato tuber moth *Pthorimaea operculella* (Seller). Journal of Islamic Academy of Sciences. Vol. 7, Nº 4.
- Hajek, A.E.; 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. Adv. Microb. Ecol., 15, p. 193-249.
- Hajek, A.E. y St. Leger R.J.; 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. Annu Rev Entomol 39: p. 293-322.
- Hallsworth, J.E. y Magan, N.; 1999. Water and temperature relations of grown of entomopatogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology, v. 74, n. 3, p. 261-266.
- Halteren, P.; 1972. Some aspects of the biology of the paddy bug, *Oebalus poecilus* (Dall.), in Surinam. Surinamse Landbouw 2: p. 23-33.
- Hegedus, D. y Khachatourians, G.; 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. Biotechnol. Adv., 13: p. 455-490.

- Hernández, V.M.; Garza, E.; Berlanga, A.M.; 1995. Control microbial de mosquitas blancas con *Paecilomyces spp.* En: Simposio sobre control biológico de mosquita blanca. 1995; p. 29-36. Tapachula, Michoacán, México.
- Hirose, E.; Neves, P.M.O.J.; Zequi, J.A.C.; Martins, L.H.; Peralta, C.H.; Moino Jr. A.; 2001. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Brazilian Archives of Biology Technology. 44(4): p. 419-423.
- Holmquist, A.M.; 1931. Studies in arthropod hibernation. III – temperatures in forest hibernacula. Ecology 12: p. 387-400.
- Hu, W.J.; Hou, R.F.N.; Talekar, N.S.; 1996. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Riptortus lienaris* (Hemiptera: Coreidae), a pest of Soybean. Appl. Entomol. Zool. 31(2): p. 187-194.
- Hull, L.A.; Beers, E.H.; 1985. Ecological sensitivity modifying chemical control practices to preserve natural enemies. In: Biological Pest Control in Agricultural Ecosystem. Academic. Press, Orlando, Florida, p. 103-121.
- Humber, R.A.; 1997. Fungi: Identification. In Manual of techniques in Insect Pathology (L.A. Lacey, ed.) Academic Press: London, p. 153-185.
- Ihara, F.; Yaginuma, K.; Kobayasshi, N.; Mishiro, K.; Sato, T.; 2001. Screening of entomopathogenic fungi against the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae) Appl. Entomol. Zool. 36 (4): p. 495–500.
- Jaronski, S.T., 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. Biocontrol. 55: p. 159-185.
- Jeffs, L.B.; Xavier, I.J.; Matai, R.E.; Khachatourians, G.G.; 1997. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. Can. J. Microbiol. 45: p. 936-948.
- Jones, R.L.; 1994. Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. Proc. Brighton crop protection conference. Weeds. Vol. 3. Brighton, RU. p. 1275-1282.

- Keller, S.; Kessler, P.; Schweizer, C.; 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *Biocontrol*, 48, p. 307-319.
- Kennard, C.P.; 1966. Effect of the paddy bug, *Oebalus poecilus* on rice yield and quality in British Guyana. Lanham: FAO, p. 54-57 (Plant Protection Bulletin, 14).
- Kershaw, M.J. y Talbot, N.J.; 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 23: p. 18-33, 83.
- Khachatourians, G.G.; 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. En Arora DK, Ajello L, Mukerji KG (Eds.) *Handbook of Applied Mycology Vol. 2: Humans, animals and insects*. Dakker. Nueva York, EEUU. p. 613-661.
- Khachatourians, G.G.; 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: HOWARD, D. H.; MILLER, J. D. (Eds.). *The Mycota*. Berlin: Springer, 1996. p. 331-364. vol. VI: human and animal relationship.
- Kishino, K.; 1993. Biología de plagas del arroz en los cerrados visando controle. Relatório do Projeto de Pesquisa. EMBRAPA COD. 001/88/0327, 1993. 71p.
- Kruger, R.D.; 2014. Control microbiano de la chinche del tallo del arroz, *Tibraca limbativentris* Stal. 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) con hongos entomopatógenos. Tesis de Maestría. 123p.
- Kunoh, H.; Yamaoka, N.; Yoshioka, H.; Nicholson, R.; 1988. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis*. L. Contact-mediated changes in morphology of the conidium surface. *Experimental Mycology* 12: p. 325-335.
- Lacey, L.A. y Goettel, M.S.; 1995. Current developments in microbial control of insects and pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga*. 40: p. 3-27.
- Lecuona, R.E.; 1996. ed. Microorganismos patógenos empleados en el Control Microbiano de insectos plaga. Taller grafico Mariano Mas, Buenos Aires. ISBN 950-43-6937-5.

- Lecuona, R.E. y Díaz, B.M.; 1996. Compatibilidad de dos cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con distintos insecticidas químicos. RIA INTA 26 (1): p.77-82.
- Lecuona, R.E.; Edelstein, J.; Berretta, M.; La Rosa, F.; Arcas, A.; 2001. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potencial agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Journal of Medical Entomology. 38(2): p. 172-179.
- Lecuona, R.E.; Papierok, B.; Riba, G.; 1996. Hongos entomopatógenos. In Lecuona, R.E.; 1996. ed. Microorganismos patógenos empleados en el Control Microbiano de insectos plaga. Taller grafico Mariano Mas, Buenos Aires. ISBN 950-43-6937-5. p. 143-150.
- Lecuona, R.E.; Riba, G.; Cassier, P.; Clement, J.L.; 1991. Alterations of insects epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B. Brongniartii*. J. Invertebr. Pathol. 58 (1): p. 10-18.
- Li, J. y Feng, M.; 2009. Intraespecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper termal limits of summer with a description of a quantitative assay system. Mycological Research. 113: p. 93-99.
- Liu, H.; Skinner, M.; Parker, B.L.; Brownbridge, M.; 2002. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). Journal of Economic Entomology, 95: p. 675-81.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Castella, G.; Kostecki, M.; Golinsky, P.; Ritieni, A.; Chelhowski, J.; 1998. Beauvericin production by *Fusarium* Species. Appl. Env. Microbiol. 64: p. 3084-3088.
- Loureiro, J.; Pinto, G.; Lopes, T.; Dolezel, J.; Santos, C.; 2005. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. Planta. 221: p. 815-822.
- Lu, J.J. y Chang, T.T.; 1980. Rice in its temporal and spatial perspectives. In: Luh BS (ed) Rice: production and utilization. s.l. p.1-74.
- Mackill, D.J.; Lei, X.M.; 1997. Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. Crop Science 37: p. 1340-1346.

- Madelin, M.F.; 1963. Diseases caused by Hyphomycetous fungi. In Steinhaus, E. A. Ed. Insect. Pathology; and advanced treatise. New York Academic press. 2: p. 233-271.
- MAGyP; 2015. Ministerio de Agroindustria de la Nación Argentina. [en línea]. <http://www.agroindustria.gob.ar/site/agricultura>
- Martins, J.F. da S.; Botton, M.; Carbonari, J.J. y Quintela, E.D.; 2004. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do Percevejo-do-Colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. Ciência Rural, Santa Maria, v.34, n.6, p. 1681-1688. ISSN 0103-8478.
- Martins, J.F. da S.; Magalhães, B.P.; Lord, J.C.; Zimmermann, F.J.P.; Ferreira, E.; 1987. Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metchni Koff) Sorokin sobre *Oebalus poecilus*, percevejo do grão do arroz. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal, v.16, n.1, p. 81-91.
- Martins, J.F. da S.; Ribeiro, A. S.; Terres, A.L.S.; 1989. Danos causados pelo percevejo do grão no arroz irrigado, p. 396-404. In Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 18. Porto Alegre, RS. 641 p.
- Maurer, P.; Couteaudier, Y.; Girard, P.A.; Bridge, P.D.; Diba, G.; 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. Mycol. Res. 101: p. 159-164.
- Meyling, N.V. y Eilenberg, J.; 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biological Control, v. 43, n. 2, p. 145-155.
- Michel, B.; 1981. Recherches expérimentales sur la pénétration des champignons pathogènes chez les insectes. Thèse Docteur de 3ème cycle. Montpellier, Université de Languedoc. 170p.
- Mielitz, L.R.; 1993. Estudo da diapausa em *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) em condições de campo. [Tese de Doutorado]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. 159p.
- Milner, J.R.; 2000. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. Biocontrol News Inf. 20: p. 47-50.
- Minten, B. y Barrett, C.B.; 2008. Agricultural technology, productivity, and poverty in Madagascar. World Development, 36(5): p. 797–822

- Moino, Jr.; 2000. Produção de fungos, vírus e bacterias entomopatogênicas, p. 173-186. In V.H.P. Bueno (ed.), Controle biológico de pragas: Produção massal e controle de qualidade. Lavras, UFLA, 196p.
- Mollier, P.; Lagnel, J.; Fournet, B.; Aïoun, A.; Riba, G.; 1994. A glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens*. Journal of Invertebrate Pathology 64: p. 200-207.
- Monzón, A.; 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. (CATIE, Costa Rica) 63: p. 95-103.
- Moore, J.; 2002. Parasites and the behaviour of animals. Oxford., UK: Oxford Univ. Press. 338p.
- Mourão, A.P.M. y Panizzi, A.R.; 2000. Diapausa e diferentes formas sazonais em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae) no norte do Paraná. An. Soc. Entomol. Brasil, 29: p. 205-218.
- Neves, P.M.O.J.; Hirose, E.; Tchujo, P.T.; Moino jr. A.; 2001. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. Neotropical Entomology, Londrina, v.30, p. 263-268.
- Nussenbaum, A.L.; 2014. Aislamiento de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). Tesis Doctora. Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires. 57p.
- Nussenbaum, A.L.; Angulo Lewylle, M.; Lecuona, R.E.; 2013. Germination, radial growth and virulence to boll weevil of entomopathogenic fungi at different temperatures. World Applied Sciences Journal 25 (8): p. 1134-1140.
- Nussenbaum, A.L. y Lecuona, R.; 2012a. Selection of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato isolates as microbial control agents against the boll weevil (*Anthonomus grandis*) in Argentina. Journal of Invertebrate Pathology 110:1, p. 1-7.
- Nussenbaum, A.L. y Lecuona, R.; 2012b. Effect of temperature on radial growth of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates pathogenic

to boll weevil, *Anthonomus grandis*. International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. 1: 61p.

- Ojeda-Chi, M.M.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Galindo-Velasco, E.; Lezama-Gutiérrez, R.; Cruz-Vázquez, C.; 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatogeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. p. 178, 182, 183.
- Orduño, C.N.; 2009. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre el picudo del nopal *Metamasius spinolae*. Montecillo, Texcoco, Estado de México. p. 7-8.
- Ortiz-Catón M.; Alatorre-Rosas R.; Valdivia-Bernal R.; Ortiz-Catón A.; Medina-Torres R.; Alejo-Santiago G.; 2011. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA SOBRE EL DESARROLLO DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. Revista Biociencias Enero 2011 Vol. 1, Núm. 2, Año 2, p. 42-53.
- Pacheco, S.C.; 2002. Efectividad biológica de los entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., sobre el picudo del agave tequilero *Sycophorus acupunctatus* Gyll. p. 59 en Atotonilco, J. Tesis Profesional. Universidad autónoma Chapingo. Departamento de Parisotolia agrícola. Chapingo, Mex.
- Pal, S.; St. Leger, R.J.; Wu, L.P.; 2007, “Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*”, en J. Biol. Chem. 282: p. 8969-8977.
- Panizzi, A.R.; 1997. Wild Hosts of Pentatomids: Ecological Significance and Role in Their Pest Status on Crops. Annu. Rev. Entomol. 1997. 42: p. 99-122.
- Papierok, B.; 1991. Les ennemies naturels d’insectes du cotonnier au Tchad: premières données sur les champignons del’ordre des entomophthorales. Coton et Fibres Tropicales, 46, p. 293-308.
- Patel, D.T.; Fuxa, J.R.; Stout, M.J.; 2006. Evaluation of *Beauveria bassiana* for Control of *Oebalus pugnax* (Hemiptera: Pentatomidae) in Rice. J. Entomol. Sci. 41 (2): p. 126-146.

- Pekrul, S. y Grula, E.A.; 1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. J. Invertebr. Pathol. 87: p. 238-247.
- Pereira, J.L.; Antunes, S.C.; Castro, B.B.; Marques, C.R.; Gonçalves, A.M.M.; Gonçalves, F.; Pereira, R.; 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. Ecotoxicology 18: p. 455–463 DOI 10.1007/s10646-009-0300.
- Pinto, L.M.N.; Beringer, J. da S.; Santos, J.R.L.; Oliveira, J.V.; Fiuza, L.M., 2007. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis thuringiensis* aos adultos de *Oebalus poecilus* (Hemiptera: Pentatomidae). In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 5., Pelotas. Anais. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007 b. p. 88-90.
- Posadas, J.B.; Comerio R.M.; Mini, J.; Nussenbaum, A.L.; Lecuona, R.; 2012. A novel dodine-free selective medium based on the use of Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) to isolate *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* sensu lato and *Paecilomyces lilacinus* from soil. Mycologia.104 (4): p. 974-980
- Posadas, J.B. y Lecuona, R.E.; 2009. Selection of Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the Microbial Control of *Rhipicephalus microplus* (Boophilus) (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology. 46 (2): p. 284-291.
- Pozo, S.C.O.; 2012. Efectividad de un microencapsulado de *Beauveria bassiana* sobre *Metamasius spinolae*. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, Morelos.
- Prasertphon, S. y Tanada, Y.; 1968. The formation and circulation, in *Galleria*, of hyphal bodies of entomophthorous fungi. J. Invertebr. Pathol. 11: p. 260-280.
- Pugliese, A.; 1955. O percevejo do arroz. Lavoura Arrozeira, 9 (99): p. 3-8.
- RAP-AL Uruguay; 2010. Contaminación y eutrofización del agua. Impactos del modelo de agricultura industrial. ISBN: 978-9974-8029-7-1. <http://www.rapaluruguay.org/agrotoxicos/uruguay/eutrofizacion.pdf>.

- Reyes, L.E.P.; 2000. Evaluación de Hongos Entomopatógenos sobre plagas claves en el cultivo de arroz. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía. Nicaragua 2000.
- Rizzo, H.F.; 1976. Hemipteros de interés agrícola, chinches perjudiciales y chinches benéficas para los cultivos. Buenos Aires, Hemisferio Sur, 69p.
- Roberts, D.W.; Fuxa, J.R.; Gaugler, R.M.; Goettel, R.J.; Maddox, J.; 1991. In Handbook of pest management in agriculture. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL., 2, p. 243-278.
- Roberts, D.W. y Hajek, A.E.; 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. In: Leatham GF, ed. Frontiers in industrial mycology. New York: Chapman & Hall. p. 144–159.
- Rodríguez del Bosque, L. A. y Arredondo Bernal, H. C.; 2007. Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. ed. 2007. 303p.
- Rossetto, C.J.; Silveira Neto S.; Link; D.; Grazia-Vieira, J.; Amante, E.; Souza, D. de; Banzato, N.V.; Oliveira, A.M.; 1972. Pragas do arroz no Brasil. In: Reunião do Comitê de Arroz para as Américas - FAO, 2, 1971, Pelotas. Contribuições Técnicas da Delegação Brasileira, Brasília: DNPEA.
- Rossetto, C.J.; Silveira Neto, S.; Link, D.; Grazia-Vieira, J.; Amante, E.; Souza, D.M. de; Banzatto, N.V.; Oliveira, A.M.; 1973. Pragas do arroz no Brasil. In: Reunião do Comitê de Arroz para as Américas, 2., 1971, Pelotas. Contribuições técnicas. Brasília, DF: Ministério da Agricultura/DNPEA, 1973. p. 149-238.
- Roy, H.E.; Steinkraus, D.C.; Eilenberg, J.; Hajek, A.E.; Pell, J.K.; 2006. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. Annual Review of Entomology. 51: p. 331-357.
- Salin, C; Delettre, Y.R.; Cannavacciuolo, M.; Vernon, P.; 2000. Spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in the soil of a poultry house along a breeding cycle. Eur J Soil Biol 36: p. 107-115.
- Samuels, R.I.; Coracini, D.L.A.; Martins Dos Santos, C.A.; Gava, C.A.T.; 2002. Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*.

Biological control, v. 23, n. 3, p. 269-273.
<http://dx.doi.org/10.1006/bcon.2001.1009>

- Santos, G.F.; 2003. Ação de *Paecilomyces lilacinus* e *Paecilomyces farinosus* sobre teleóginas de *Boophilus microplus*. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Micologia. Tesis Mestre em Biologia de Fungos. p. 8.
- Santos, R.S.S.; Prando, H.F.; Redaelli, L.R.; Diefenbach, L.M.G.; Romanowski, H.P.; 2001. Mortalidade de *Oebalus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em condições de laboratório. In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2., Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: IRGA. p. 419-421.
- Santos, R.S.S.; Prando, H.F.; Redaelli, L.R.; Diefenbach, L.M.G.; Romanowski, H.P.; 2002. Ocorrência Natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em Adultos Hibernantes de *Oebalus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) Neotropical Entomology 31(1), p. 153-155.
- Santos, R.S.S.; Redaelli, L.R.; Diefenbach, L.M.G.; Romanowski, H.P.; Prando, H.F.; 2003. Characterization of the imaginal reproductive diapause of *Oebalus poecilus* (Dallas) (hemiptera: pentatomidae) Braz. J. Biol., 63(4), p. 695-703.
- Santos, R.S.S.; Redaelli, L.R.; Diefenbach, L.M.G.; Romanowski, H.P.; Prando, H.F.; Antochévis, R.C.; 2004. Distribuição espacial de *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) durante a hibernação. Entomotropica ISSN 1317-5262 Vol. 19(2): 91-100. Agosto 2004.
- Santos, R.S.S.; Redaelli, L.R.; Diefenbach, L.M.G.; Romanowski, H.P.; Prando, H.F.; Antochévis, R.C.; 2006. Seasonal Abundance and Mortality of *Oebalus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) in a Hibernation Refuge. Braz. J. Biol., 66(2A): p. 447-453.
- Schapovaloff, M.E.; Angeli Alves, L.F.; Urrutia, M.I.; López Lastra, C.C.; 2015. Ocorrência natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2015; 47(2): p. 138-142.

- Schwertner, C.F. y Grazia, J. 2007. O gênero *Chinavia orian* (Hemiptera, Pentatomidae, Pentatominae) no Brasil, com chave pictórica para os adultos. *Revista Brasileira de Entomologia* 51(4): 416-435.
- Sevím, A.; Demir, I.; Sönmez, E.; Kocaçevik, S.; Demirbağ, Z.; 2013. Evaluation of entomopathogenic fungi against the sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* (2013) 37: p, 595-603.
- Silva, R.B.Q. y Veiga, A.F.S.L.; 1998. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, sobre *Castnia icarus* (Cramer, 1775). *Ver. Agric.* 73: p.119-127.
- Squire, F.A.; 1934. A study of *Mormidea poecila* Dall. *Agr. Jour. Brit. Guiana, Georgetown*, 5(4): p. 245-252.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M.; 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: p. 85-95.
- St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M.; 1987a. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry Biophysics* 253(1): p. 221-232.
- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K.; 1987b. Production of cuticle-degrading enzymes by entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology* 133: p. 1371-1382.
- St. Leger, R.J.; Durrands, P.K.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M.; 1988b. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52: p. 285-293.
- St. Leger, R.J.; Durrands, P.K.; Cooper, R.M.; Charnley, A. K.; 1988c. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology* 150: p. 413-416.
- St. Leger, R.J.; Roberts, D.W.; 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol.* 15: p. 83-87.
- Tanada, Y. y Kaya, H.K. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, New York, NY, p 413.

- Tariq, M.I.; Afzal, S.; Hussain, I.; Sultana, N.; 2007. Pesticide exposure in Pakistan: a review. *Environ Int* 33: p. 1107–1122.
- Tauber, M.J.; Tauber, C.A.; Masaki, S.; 1986. Seasonal adaptations of insects. Oxford University Press, New York, 411p.
- Tefera, T. y Pringle, K.L.; 2003. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 84: p. 220-225.
- Télles Jurado, A.; Cruz Ramirez, M.G.; Flores, Y.M.; Torres, A.A.; Arana-Cuenca, A.; 2009. Mecanismo de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología* 30: p. 73-80.
- Tigano-Milani. M.S.; Faria, M.R.; Martins, I.; Lecuona, R.; 1993. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok e *Paecilomyces sp.* em solos de diferentes regiões do Brasil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 22 (2): p. 391-393.
- Tigano-Milani, M.S.; Gomes, A.C.M.M.; Sobral, B.W.S.; 1995. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.65, p. 206-210.
- Triplehorn, C.A y Johnson, N.F.; 2005. Borror and DeLong's – Introduction to the Study of Insects. 7 ed. ISBN: 0-03-096835-6.
- Tyrrell, D.; 1977. Occurrence of protoplast in the natural life cycle of *Entomophthora egressa*. *Exp. Mycol.* 7: p. 414-422.
- United States Department of Agriculture. (USDA); 2013. <http://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>.
- Vänninen, I.; 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycol. Res.* 100, p. 93-101.
- Van Driesche, R.G. y Bellows, T.S. 1996. Biological control. Chapman & Hall. 539 p.
- Vecchio, M.C.; Grazia, J.; Albuquerque, G.S.; 1994. Dimorfismo sazonal em *Oebalus ypsilongriseus* (De Geer, 1773) (Hemiptera: Pentatomidae) e uma

nova sinonímia. Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, 38(1): p. 101-108.

- Vecco, G.C.D.; Jiménez, G.L.E.; 2004. Sociedad Entomológica del Perú. Resúmenes XLVI Convención Nacional de Entomología. Arequipa.
- Vega, F.E. y Blackwell, M.; 2005. Insect-Fungal associations. Ecology and evolution. Ed. Oxford. University press., p 297.
- Vega, F.E.; Posada, F.; Aime, M.C.; Pava-Ripoli, M.; Infante, F.; Rehner, S.A.; 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. Biological Control. 46: p. 72–82.
- Vey, A.; 1971. Étude des réaction cellulaires anticryptogamique chez *Galleria mellonella* L.: structure et ultrastructure des granulomes à *Aspergillus niger* V. Tiegh. Ann. Zool. Ecol. Anim. 3: p. 17-30.
- Vey, A. y Götz, P.; 1986. Antifungal celular defense mechanisms in insects. In Gupta A. P. ed. Hemocytic and humoral immunity in arthropods. New York, Jhon Wiley. p. 89-115.
- Vey, A. y Vago, C.; 1971. Reaction anticryptogamique de type granulome chez les insects. Ann. Institute Pasteur 121: p. 527-532.
- Vidal, C.; Fargues, J.; Lacey, L.A.; 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. Journal of Invertebrate Pathology. 70: p. 18-26.
- Vieira, N.R. de A.; Santos, A.B.; Santana, E.P.; 1999. A cultura do arroz no Brasil. Santo Antônio de Goiás: Embrapa-CNPAP, p. 633.
- Viggiani, A. R.; 1990. Hacia el control integrado de plagas. Editorial Hemisferio Sur S.A. Argentina. ISBN 950-504-448. p. 124.
- Vo, T.B.C.; 2005. Economic performance by using bio-insecticides and chemical insecticides to control rice insect pests. Omonrice 13: p. 63-68.
- Wei-Zhen L., Boucias, D.G.; McCoy, C.W.; 1995. Extraction and characterization of the insecticidal toxin Hirsutellin A produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. Experimental Mycology 19: p. 254-262.
- Wessels, J.G.H.; 1999. Fungi in their own right. Fungal Genet. Biol. 27: p. 134-145.
- Wilson, P.C. y Foos, J.F.; 2006. Survey of carbamate and organophosphorous pesticide export from a South Florida (USA) agricultural

watershed: implications of sampling frequency on ecological risk estimation. *Environ Toxicol Chem* 25: p. 2847–2852. doi:10.1897/06-048.1.

- Wilson, F. y Huffaker, C.B.; 1976. The philosophy, scope, and importance of biological control, p. 3-15. In: C.B. Huffaker & P.S. Messenger (eds.), *Theory and practice of biological control*. Academic Press, N.Y.
- World Agricultural Outlook Board; 2013. Foreign Agricultural Service. Production, supply and Distribution. Visita: 20-6-13.
- Zimmermann, G.; 1986. Insect pathogenic fungi as pest control agents. En: *Biological Plant and Health Protection*. (Franz, J. M., Ed.) G. Fischer Verlag, Stuttgart p. 217- 231.
- Zimmermann, G; 2007. “Revisión de seguridad del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*”; *Biocontrol Ciencia Y Tecnología*, 17:9, p. 879 – 920.
- Zucchi, R.A.; Silveira Neto, S.; Nakano, O.; 1993. *Guia de identificação de pragas agrícolas*. Piracicaba, SP.: Fealq, 1993. 139p.