

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**Facultad de Ciencias Naturales y Museo**

**Hongos patógenos asociados a "moscas de la fruta" (Diptera: Tephritidae) en el sector austral de Las Yungas del noroeste argentino**



Tesis para optar al título de Doctor en  
Ciencias Naturales

Lic. Patricia Albornoz Medina

Directora: Dra. Claudia López Lastra

Director: Dr. Sergio Marcelo Ovruski Alderete

**La Plata, 2014**

*A la memoria de mi Padre*

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ *A Dios por concederme el Don de la Vida.*
- ❖ *Al Dr. Sergio Ovruski por depositar su entera confianza en mí y brindarme los medios para mi formación y sus valiosos conocimientos para la realización y culminación de este trabajo de investigación.*
- ❖ *A la Dra. Claudia López Lastra por abrirme las puertas al mundo de la micología y brindarme su amistad y confianza. Y por su importante aporte de conocimientos para la realización de este trabajo de investigación.*
- ❖ *A la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) por financiar parte de mi tesis doctoral mediante el otorgamiento de las Becas de Iniciación y de Perfeccionamiento en la Investigación o Desarrollo Científico, Tecnológico y Artístico.*
- ❖ *Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la Beca Interna de Postgrado TIPO II para concluir con mi trabajo de tesis doctoral.*
- ❖ *A la directora de la Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI-Biotecnología-CONICET, Dra. Lucía Castellanos de Figueroa por haber permitido realizar mis tareas de investigación en dicho Instituto.*
- ❖ *A la directora del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE-UNLP-CONICET), Dra. Alda González y a la co-directora, Dra. Graciela Navone, por haber permitido realizar mis tareas de investigación en dicho instituto.*
- ❖ *A las entidades que financiaron los proyectos en el marco del cual se desarrolló el presente trabajo de tesis: a) Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (PFIP - ESPRO); b) Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT n°2403, PICT n°393); c) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP n°5129), y d) Facultad de Ciencias Naturales y Museo (Proyecto N580).*
- ❖ *A la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes, Tucumán por proporcionarme los datos meteorológicos.*
- ❖ *A la Dra. Marta Cabello por su valiosa colaboración en la identificación de los aislamientos fúngicos.*
- ❖ *A la Dra. Julia Fariña, por permitir la utilización del equipamiento de su laboratorio.*

- ❖ *A las Autoridades del Parque Provincial Sierra de San Javier-UNT por autorizar la realización de los muestreos en dicho Parque.*
- ❖ *A la Sra. Margarita Olima por brindarme su amistad y permitirme realizar parte los muestreos en su propiedad.*
- ❖ *A mis compañeros del Laboratorio de Investigaciones Ecoetológicas de Moscas de la Fruta y sus Enemigos Naturales de PROIMI: Laura Bezdjian, Cristina Martín, Claudia Fidelis Marinho, Lorena Escoba, Natalia Salinas, Josefina Buonocore, Emilia Rodríguez, Patricia Colombres, Liliana Colombres, Pablo Schliserman, Luis Oroño, Guido Van Nieuwenhove, Javier Altamirano, Segundo Núñez Campero, Patricio Silva, Mario Stepanenko, Ulises Chaya y Guillermo Borchia por la ayuda brindada.*
- ❖ *A mis compañeros del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE: Alejandra Gutiérrez, Celeste D'Alessandro, Belén Cabrera, Romina Manfrino, María Elena Schapovaloff y Julieta Tornesello por la ayuda brindada.*
- ❖ *A Laura Bezdjian, Cristina Martín, Lorena Escobar, Guadalupe Cordova García, Vanesa Rodríguez, Luis Oroño, Pablo Scliserman, Guido Van Nieuwenhove y Mario Stepanenko por su colaboración en el trabajo de Campo y de Laboratorio.*
- ❖ *A Julieta Tornesello por su dedicación al mantenimiento e ingreso de las cepas aisladas en el presente trabajo a la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE.*
- ❖ *A mis Padres por enseñarme el Valor del Estudio y la importancia de la Perseverancia.*
- ❖ *A mi Madre por iluminar con su Amor y Ternura cada instante de mi vida y por trasmitirme su Fortaleza.*
- ❖ *A mi Padre por su consejo al comenzar mi doctorado: “Valora cada instante de tu vida y cada viaje. Cada uno de ellos serán irrepitibles y se convertirán en recuerdos únicos”.*
- ❖ *A mis hermanos Juan José, Marcela Silvana, María Eugenia, Julia Mariana, por su cariño, apoyo y respeto en cada emprendimiento de mi vida.*
- ❖ *A mis sobrinos Mariana, Maía, Justina, Franco, Matías, Benjamín, Leandro y Augusto por brindarme la cuota diaria de Sonrisas que hacen que mi vida este llena de Felicidad.*
- ❖ *A mis amigos Analía Delgado, María Luisa Rozzi, Leonor Guardia Claps, Elisa Fanjul, Fiorella Gómez, Lorena Cangemi, Eva Tejerina, Mirna Oviedo, Erica Luft, Karina Garcia, Laura Babot, Lorena Escobar, Natalia Salinas, Claudia Fidelis Marinho, Laura Bezdjian, Cristina Martín, Guadalupe Cordova García, Silvana Viñarta, María Eugenia Cabral, Gabriela Mansilla, Edith Piccinetti, Alejandra Herrera, Romina Herrera, Eneas Toranzo*

*Rozzi, Segundo Núñez Campero, Pablo Schliserman, Luis Oroño, Alvaro Foieri, Javier Altamirano, Guido van Nieuwenhove, Sebastián Varas y Pblo Fernandez por estar siempre alentándome en cada paso de mi vida.*

- ❖ *A mis amigos “colectados” a lo largo de este viaje llamado doctorado, Cintia Luna, Gisele Perco, Luz Cardozo, Ana Favero, Diana Lezama, Katherine Duarte, Paula Sanchez, Florencia Higuera, Victoria Mallofré, Natalia Sanchez, Flavia Cardoso, Florencia Guidozzolo, María Fernanda Rossi, Jorgelina Villanova y Estefania Fernandes por permitirme ser parte de sus vidas.*

## Índice

---

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
|           | <b>RESUMEN</b>  | <b>1</b>  |
|           | <b>ABSTRACT</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.</b> | <b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>   | <b>7</b>  |
| <b>2.</b> | <b>ANTECEDENTES</b>   | <b>10</b> |
| 2.1.      | Familia Tephritidae   | 10        |
| 2.2.      | Importancia Económica   | 11        |
| 2.3.      | Plaga-Agroecosistema  | 13        |
| 2.4.      | Manejo Integrado de “Moscas de la Fruta” en Argentina                       | 15        |
| 2.5.      | Hongos Entomopatógenos  | 17        |
| 2.6.      | Interacción Patógeno-Huésped  | 19        |
| 2.7.      | Mecanismo de Acción de los Hongos Entomopatógenos                           | 20        |
| 2.8.      | Ocurrencia Natural de Hongos Entomopatógenos en “Moscas de la Fruta”        | 23        |
| 2.9.      | Manejo Integrado de “Moscas de la Fruta” a través de Hongos Entomopatógenos | 23        |
| 2.10      | Interacción hongos entomopatógenos-parasitoide                              | 25        |
|           | <b>HIPÓTESIS</b>  | <b>27</b> |
|           | <b>OBJETIVO GENERAL</b>   | <b>27</b> |
|           | <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>  | <b>27</b> |
| <b>3.</b> | <b>MATERIALES y MÉTODOS</b>   | <b>29</b> |
| 3.1.      | Área de estudio   | 29        |
| 3.2.      | Recolección de material en campo  | 30        |
| 3.3.      | Prospección en laboratorio del material colectado                           | 32        |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| 3.4.       | Métodos de aislamiento y preservación de hongos entomopatógenos  | 33 |
| 3.5.       | Selección de cepas patógenas de “moscas de la fruta”   | 35 |
| 3.6.       | Identificación, caracterización morfológica y fisiológica de las cepas de <i>Beauveria bassiana</i> nativas de Las Yungas  | 36 |
| 3.6.1.     | Identificación y caracterización morfológica de las cepas de <i>B. bassiana</i>  | 36 |
| 3.6.1.1.   | Morfología macroscópica  | 37 |
| 3.6.1.2.   | Morfología microscópica  | 37 |
| 3.6.2.     | Caracterización fisiológica de las cepas de <i>B. bassiana</i>   | 38 |
| 3.6.2.1.   | Porcentaje de germinación (viabilidad)   | 38 |
| 3.6.2.2.   | Producción de conidios (esporulación)  | 39 |
| 3.6.2.3.   | Crecimiento radial. Tasa de crecimiento  | 40 |
| 3.6.2.4.   | Análisis estadístico   | 41 |
| 3.7.       | Mantenimiento de la cría artificial de <i>A. fraterculus</i> y <i>C. capitata</i>  | 41 |
| 3.8.       | Evaluación de la incidencia y variación estacional de las infecciones fúngicas en <i>Anastrepha fraterculus</i> y <i>Ceratitis capitata</i> (Diptera: Tephritidae) en Guayaba, Durazno y Nogal | 43 |
| 3.8.1.     | Análisis estadístico   | 44 |
| 3.9.       | Pruebas de patogenicidad realizadas con hongos entomopatógenos contra <i>Anastrepha fraterculus</i> y <i>Ceratitis capitata</i>  | 45 |
| 3.9.1.     | Pruebas de patogenicidad realizadas con hongos nativos aislados de <i>A. fraterculus</i> (hospederos tefritidos)   | 45 |
| 3.9.1.1.   | Pruebas realizadas mediante el método de inmersión contra larvas de <i>A. fraterculus</i>  | 47 |
| 3.9.1.1.1. | Obtención del inóculo y diseño experimental  | 47 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| 3.9.1.1.2. | <u>Seguimiento post-inoculación</u>  | 48 |
| 3.9.1.2.   | <u>Pruebas realizadas mediante el método de espolvoreo contra larvas de <i>A. fraterculus</i> y <i>C. capitata</i></u>   | 48 |
| 3.9.1.2.1. | <u>Diseño experimental</u>   | 49 |
| 2.9.2.     | <u>Análisis estadístico</u>  | 49 |
| 3.9.3.     | <u>Pruebas de patogenicidad realizadas con hongos aislados de hospederos no-tefrítidos</u>   | 50 |
| 3.9.3.1.   | <u>Obtención del inóculo y diseño experimental</u>   | 51 |
| 3.9.3.1.1. | <u>Pruebas realizadas contra adultos de <i>A. fraterculus</i></u>  | 52 |
| 3.9.3.1.2. | <u>Pruebas realizadas contra larvas de <i>A. fraterculus</i></u>   | 53 |
| 3.9.3.2.   | <u>Seguimiento post-inoculación</u>  | 53 |
| 3.10.      | <u>Evaluación del sinergismo entre un parasitoide nativo del neotrópico y un hongo entomopatógeno aislado de un hospedero no-tefrítido sobre larvas de <i>C. capitata</i> en condiciones experimentales de campo</u> | 53 |
| 3.10.1.    | <u>Hongo entomopatógeno</u>  | 54 |
| 3.10.2.    | <u>Parasitoide</u>   | 54 |
| 3.10.3.    | <u>Insecto plaga huésped</u>   | 55 |
| 3.10.4.    | <u>Planta hospedera</u>  | 55 |
| 3.10.5.    | <u>Obtención del inóculo y diseño experimental</u>   | 55 |
| 3.10.6.    | <u>Análisis estadístico</u>  | 58 |
| <b>4.</b>  | <b><u>RESULTADOS</u></b>   | 60 |
| 4.1.       | <u>Identificación de los hongos entomopatógenos y caracterización morfológica y fisiológica de las cepas de <i>Beauveria bassiana</i> aisladas larvas de <i>A. fraterculus</i></u>                                   | 60 |
| 4.2.       | <u>Incidencia y variación estacional de las infecciones fúngicas en <i>Anastrepha fraterculus</i> y <i>Ceratitis capitata</i> (Diptera: Tephritidae) en Guayaba, Durazno y Nogal</u>                                 | 66 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| 4.3.      | Patogenicidad de cepas del hongo entomopatógeno <i>B. bassiana</i> aisladas de larvas de <i>A. fraterculus</i>  | 87  |
| 4.3.1.    | Patogenicidad contra larvas de <i>A. fraterculus</i> (inmersión)  | 87  |
| 4.3.2.    | Patogenicidad de <i>B. bassiana</i> contra larvas de <i>A. fraterculus</i> y <i>C. capitata</i> (espolvoreo)  | 89  |
| 4.3.3.    | Comparación entre los dos métodos de aplicación de cepas de <i>B. bassiana</i>  | 94  |
| 4.4.      | Patogenicidad de hongos entomopatógenos aislados de hospederos no-tefrítidos  | 100 |
| 4.5.      | Evaluación del sinergismo entre el parasitoide pupal <i>Coptera haywardi</i> y el hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> aislado de un hospedero no tefrítido contra larvas de <i>Ceratitis capitata</i> en condiciones experimentales de campo | 102 |
| <b>5.</b> | <b>DISCUSIÓN</b>  | 108 |
| 5.1.      | Prospección de hongos entomopatógenos   | 108 |
| 5.2.      | Patogenicidad   | 109 |
| 5.2.1.    | Patogenicidad de cepas de <i>B. bassiana</i> aisladas de larvas de <i>A. fraterculus</i>  | 109 |
| 5.2.1.1.  | Patogenicidad de los estados inmaduros de <i>A. fraterculus</i> y <i>C. capitata</i>  | 109 |
| 5.2.1.2.  | Patogenicidad de <i>B. bassiana</i> sobre adultos de <i>A. fraterculus</i> y <i>C. capitata</i>   | 111 |
| 5.2.2.    | Patogenicidad de cepas aisladas de hospederos no-tefrítidos sobre <i>A. fraterculus</i>   | 113 |
| 5.2.2.1.  | Patogenicidad de <i>B. bassiana</i> e <i>I. fumosorosea</i> sobre adultos de <i>A. fraterculus</i>  | 113 |
| 5.2.2.2.  | Patogenicidad de cepas de <i>B. bassiana</i> sobre larvas de <i>A. fraterculus</i>  | 114 |
| 5.2.3.    | Sinergismo entre <i>Coptera haywardi</i> y <i>Beauveria bassiana</i> contra larvas de <i>Ceratitis capitata</i> en condiciones experimentales de campo  | 115 |

|    |                                   |     |
|----|-----------------------------------|-----|
| 6. | <hr/> <b>CONCLUSIONES</b> <hr/>   | 117 |
| 7. | <b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> <hr/> | 119 |
| 8. | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> <hr/> <hr/>   | 120 |

**RESUMEN**

La presencia en Argentina de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) (especie nativa) y *Ceratitis capitata* (especie exótica) limitan la exportación de frutas y hortalizas al estado fresco, ya que estas plagas son de importancia cuarentenaria. A nivel mundial existe una tendencia a disminuir el empleo de plaguicidas de síntesis contra “moscas de la fruta”, debido fundamentalmente a los efectos nocivos de estos sobre el ambiente y la salud humana, sumado a la necesidad de la conservación de la biodiversidad en los agro-ecosistemas. Por tal motivo, los programas para su control se basan en la utilización de un sistema integrado de técnicas bio-rationales o no contaminantes. Como medio bio-rracional de control de estas especies, en Argentina se emplean la técnica del insecto estéril y un himenóptero parasitoide exótico. El uso de microorganismos patógenos como agentes de control biológico es de gran importancia, debido a las enfermedades epizoóticas sobre poblaciones de insectos plaga. Entre ellos, los hongos constituyen un importante grupo de patógenos de insectos y otros artrópodos plaga y son considerados excelentes candidatos como agentes de control biológico, ya que pueden infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula, presentan dispersión activa y pasiva, persistencia en el medio, tolerancia a factores adversos debido al desarrollo de esporas de resistencia, y su manipulación *in vitro* es relativamente fácil. En Argentina existen varias referencias sobre la presencia y el uso de hongos patógenos sobre insectos plaga, sin embargo, aún no han sido utilizados contra “moscas de la fruta”. Por tal motivo la finalidad de la investigación fue seleccionar especies de hongos patógenos que puedan ser utilizados como agentes de control de *A. fraterculus* y *C. capitata*.

Se realizó la prospección semanal de larvas y pupas de *A. fraterculus* y *C. capitata* que se encontraban en fruta de nogal, durazno y guayaba y en suelo, en la selva de Las Yungas durante los veranos de 2007-2008, 2008-2009 y 2009-2010. Como resultado se obtuvieron 59 aislamientos fúngicos, de los cuales 4 correspondieron al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*

(Hypocreales: Cordycipitaceae) aislados de larvas de *A. fraterculus*, 31 al género *Fusarium* Link, 12 al género *Aspergillus* Link, 6 a los géneros *Penicillium* Link y *Mucor* Micheli.

Se evaluó la patogenicidad de los 4 aislamientos nativos de *B. bassiana* sobre larvas de *A. fraterculus*, mediante el método de inmersión y de larvas de *A. fraterculus* y *C. capitata*, mediante el método de espolvoreo. Y se siguió la mortalidad diferida en pupas y adultos. La mortalidad de larvas y pupas de las dos especies de tefritidos fue mayor al 55% cuando fueron tratadas por el método de espolvoreo. Valores menores al 27% fueron registrados para larvas y pupas de *A. fraterculus* inoculadas por el método de inmersión. En el caso de los adultos de ambas especies los porcentajes de mortalidad fueron menores al 1% y 22%, mediante la aplicación del inóculo por inmersión y espolvoreo, respectivamente. Se observó que el método de espolvoreo fue más efectivo para el control de los estados inmaduros y que causó un control de la plaga del 80%.

También se evaluó la mortalidad de 3 aislamientos de *B. bassiana* y 1 de *Isaria fumosorosea* Wizw (Eurotiales: Trichocomaceae) aislados de hospederos no tefritidos, contra larvas y adultos de *A. fraterculus*, inoculados mediante los métodos de aspersion en tierra e inmersión y aspersion, respectivamente. Se registró una mortalidad entre 12 y 16% para larvas y pupas. Los adultos inoculados por inmersión registraron mortalidades de 44% y 86%, mientras que los inoculados por aspersion menor al 12%.

Se realizó un ensayo para evaluar la acción conjunta de *B. bassiana* aislado a partir de *Myzus* sp (Hemiptera: Aphididae) y del parasitoide de pupas *Coptera haywardi* Loíacono (Hymenoptera: Diapriidae) para el control de *C. capitata*, tanto cuando actuaron juntos como separados, en condiciones de semicampo. Las larvas de la plaga fueron inoculadas mediante la aspersion del inóculo en suelo y se hizo un seguimiento en los estados de pupa y adulto. La acción conjunta de ambos enemigos naturales produjo un control del 95% (eficacia), siendo los adultos el estado más susceptible, mientras que *B.*

*bassiana* y *C. haywardi* produjeron un control de 65% y 45%, respectivamente, cuando actuaron independientemente. La mortalidad del hongo sobre el parasitoide fue del  $15,6 \pm 1,8\%$ .

De estos estudios podemos concluir que para lograr un efectivo control de las “moscas de la fruta” es preferible el empleo de cepas aisladas a partir de ellas mismas. Por otra parte se observó que el método de aplicación más efectivo sería la inoculación del hongo en suelo, de este modo las larvas se infectarían al momento de enterrarse y al permanecer en el suelo junto con las pupas muertas y esporuladas, serían una fuente de inóculo para la infección de los adultos emergentes. En cuanto a las cepas nativas de *B. bassiana* aisladas de larvas de *A. fraterculus*, se deberían realizar evaluaciones a campo y pruebas de patogenicidad sobre adulto, debido a que no fue evaluado en el presente trabajo.

**ABSTRACT**

The presence in Argentina of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) (native species) and *Ceratitis capitata* (exotic species) limit the export of fruit and vegetables to fresh, because these pests are of quarantine significance. Globally there is a tendency to reduce the use of synthetic pesticides against "fruit flies", mainly due to the adverse effects to the environment and human health, coupled with the need for conservation of biodiversity in agro-ecosystems. For that reason control programs are based on the use of integrated system bio-rational or non-polluting techniques. As a means of bio-rational control of these species, in Argentina the sterile insect technique as an exotic parasitoid wasp used. The use of pathogenic microorganisms as biological control agents is of great importance due to epizootic diseases on insect pest populations. Among these fungi constitute an important group of insect pathogens, and other arthropod pests and are considered excellent candidates as biological control agents, because they can infect insects directly through the penetration of the cuticle, with active and passive scattering, persistence in the environment, adverse factors tolerance due to development of resistance spores and it's in vitro manipulation is relatively straightforward. In Argentina there are several references to the presence and use of pathogenic fungi on pest insects, however, have not yet been used against fruit flies. Therefore the aim of the research was to select species of pathogenic fungi that can be used as control agents of *A. fraterculus* and *C. capitata*.

Weekly prospecting of larvae and pupae of *A. fraterculus* and *C. capitata* was conducted, were in fruit walnut, peach and guava and soil, in the jungle of Las Yungas during the summers of 2007-2008, 2008-2009 and 209-2010. Were obtained 59 fungal isolates 4 of them belong to the species of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae: Hypocreales) larvae isolated *A. fraterculus*, 31 to *Fusarium* Link, 12 to *Aspergillus* Link, 6 to *Penicillium* Link and *Mucor* Micheli.

Pathogenicity of four native isolates of *B. bassiana* was evaluated on larvae of *A. fraterculus*, by the immersion method and larvae of *A. fraterculus* and *C. capitata*, by the method of powdering. And the mortality in pupae and adults was followed. The mortality of larvae and pupae of the two species of Tephritidae was greater than 55% when treated by the method of dusting. Values less than 27% were recorded for larvae and pupae of *A. fraterculus* inoculated by immersion method. For the adults of both species mortality percentages were lower than 1% and 22%, by applying the inoculum by immersion and sprinkling respectively. It was observed that the dusting method was more effective for the control of immature stages and caused a pest control 80%.

Mortality of 3 isolates of *B. bassiana* we also evaluated and 1 *Isaria fumosorosea* Wizw (Hypocreales: Cordycipitaceae) isolated from hosts not tephritidae against larvae and adults of *A. fraterculus* inoculated by spraying methods, and immersion and sprinkling ground respectively. Mortality between 12 and 16% for larvae and pupae were recorded. Adults inoculated by immersion mortalities recorded 44% and 86%, while the lower spray inoculated at 12%.

A trial was conducted to evaluate the action of *B. bassiana* isolated from *Myzus* sp (Hemiptera: Aphididae) and parasitoid pupae *Coptera haywardi* Loiácono (Hymenoptera: Diapriidae) in the control of *C. capitata*, both together and separately when they performed in semi-field conditions. The larvae of the pest were inoculated by spraying the inoculum in soil and were followed in the states of pupa and adult. The combined action of both natural enemies produced a 95% control (effectiveness), adults being more susceptible state. While *B. bassiana* and *C. haywardi* control were 65% and 45%, respectively, when acting alone. The mortality of the fungus on the parasitoid was of  $15,6 \pm 1,8\%$ .

From these studies we can conclude that for effective control "fruit flies" employment is preferable strains isolated from themselves. And the most

effective method of application would be the inoculation of the fungus in soil, thus larvae become infected when buried and that by staying in the soil of dead pupae and sporulated would be a source of inoculum for infection of adult emerging. As for the native strains of *B. bassiana* isolated from larvae of *A. fraterculus*, should perform field evaluations and pathogenicity tests on adult, because it was not assessed in this study.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La presencia en Argentina de plagas limitantes de la producción de frutas y hortalizas al estado fresco, afecta la exportación de estos productos hacia nuevos mercados. En este contexto, debe destacarse un grupo de dípteros comúnmente llamados “moscas de los frutos”, de las cuales *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), es una especie nativa de América del Sur ampliamente distribuida en la Región Neotropical. En Argentina, está presente principalmente en regiones húmedas del noroeste y del noreste (Ovruski *et al.*, 2003), aunque también existen poblaciones establecidas en valles irrigados de la región cuyana con clima más templado (Guillén y Sánchez, 2007), y *Ceratitis capitata* (Wiedeman), especie exótica de la región mediterránea, son de importancia económica (Guillén y Sánchez, 2007).

Actualmente existe a nivel mundial una tendencia a disminuir el empleo de productos químicos en cultivos frutihortícolas contra “moscas de la fruta”, debido fundamentalmente a los efectos nocivos de los plaguicidas sobre el medioambiente y la salud humana, sumado a la necesidad de la conservación de la biodiversidad en los agro-ecosistemas. Por tal motivo, los programas relacionados al control de tefrítidos plagas se basan hoy en día en la utilización de un sistema integrado de técnicas bio-rationales no contaminantes (Aluja y Rull, 2009).

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es un sistema de apoyo a la toma de decisiones para la selección y el uso de tácticas, individuales o múltiples, para el control de plagas, las cuales se coordinan armoniosamente en una estrategia de manejo basada en un análisis de costos con relación a los beneficios, considerando los intereses e impactos sobre los productores, la sociedad y el ambiente (Kogan y Shenk, 1998). En este sentido, las principales opciones para el control biorracional de tefrítidos plaga la constituyen la técnica del insecto estéril (TIE) y el control biológico (CB) a través de la utilización de enemigos naturales (EN), como por ejemplo himenópteros parasitoides,

depredadores y entomopatógenos (Aluja, 1996; Ovruski y Schliserman, 2012). Justamente, para lograr la erradicación de *C. capitata* en Argentina, se emplea la TIE en las provincias de Mendoza, San Juan, La Rioja y en la región Patagónica, mediante el Programa Nacional de Control y Erradicación de Moscas de la Fruta (ProCEM Nacional) perteneciente al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (Guillén y Sánchez, 2007). Con respecto al empleo de parasitoides en el control biológico de estas plagas, se introdujo al país desde México una especie exótica, la cual es criada simultáneamente en PROIMI-Biotecnología, provincia de Tucumán, (Ovruski *et al.*, 2003), el INTA de Castelar, provincia de Buenos Aires (Viscarret *et al.*, 2006) y en la BioPlanta San Juan, Provincia de San Juan (Suarez *et al.*, 2012).

Aunque el uso de microorganismos patógenos como agentes de biocontrol es de gran importancia, debido a las enfermedades epizooticas sobre poblaciones de insectos plaga (Sosa Gómez y Moscardi, 1991), estos enemigos naturales aún no han sido utilizados en la Argentina contra “moscas de la fruta”.

Por lo mencionado anteriormente, este proyecto de tesis presenta los primeros estudios sobre hongos patógenos asociados con “mosca de la fruta” en la región Noroeste de Argentina (NOA), esta es una región frutihortícola de gran importancia en el país. En esta región, principalmente en el sector de selva de Las Yungas, coexisten *A. fraterculus* y *C. capitata* atacando una amplia variedad de frutos cultivados y silvestres (Ovruski *et al.*, 2003). Además en el NOA, especialmente en Tucumán, existen otras especies del género *Anastrepha* (Blanchard, 1961) pero sin importancia económica, de las cuales solo para *A. schultzi* Blanchard se conoce la planta hospedadora (Schliserman *et al.*, 2004). La finalidad de la investigación fue seleccionar especies de hongos patógenos que puedan ser utilizados como agentes de control de *A. fraterculus* y *C. capitata* en Argentina. Esta línea de investigación forma parte del trabajo conjunto que se realiza en el Laboratorio de Investigaciones Ecoetológicas de Moscas de la Fruta y sus Enemigos Naturales (LIEMEN), en

PROIMI-Biotecnología, San Miguel de Tucumán, Tucumán. El objetivo del LIEMEN es el desarrollo de estrategias no contaminantes de control de *A. fraterculus* y *C. capitata*, en los sistemas frutihortícolas, basadas en el uso de enemigos naturales nativos. Estas estrategias constituirían una alternativa de control de ambos insectos plaga más segura para el hombre y el medioambiente.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1. Familia Tephritidae

La familia Tephritidae se encuentra dentro del orden Diptera de la clase Insecta. Dentro de esta familia se encuentran a las denominadas “moscas de la fruta”, las cuales causan importantes daños en frutales cultivados en diversas regiones del mundo, debido a que sus larvas se alimentan y desarrollan en el interior de los frutos, constituyéndose una plaga cuarentenaria a nivel mundial.

Esta familia se distribuye ampliamente en el mundo y muchas de las especies están adaptadas a un amplio rango climático (Bateman, 1968). Se reportó que existen alrededor de 5.000 especies de tefritidos en el mundo distribuidas en las regiones tropicales, subtropicales y templadas y más de 400 se encuentran en el continente Americano (Celedonio-Hurtado, 1988).

Tres subfamilias pueden diferenciarse dentro de los tefritidos: Dacinae, Trypetinae y Tephritinae (Foote *et al.*, 1993).

La subfamilia Dacinae está constituida por especies cuyas larvas son comedoras de frutas, semillas y flores, siendo muchas de ellas de importancia económica para la agricultura mundial. Entre los géneros de valor económico para la fruticultura del mundo están *Ceratitis* Macleay, *Bactrocera* Macquart y *Dacus* Fabricius (Foote *et al.*, 1993). En la Argentina la subfamilia está representada solamente por *C. capitata*, conocida comúnmente como “mosca del mediterráneo” o “moscamed”, originaria del norte de Africa e introducida en América en 1901 (Norrbom y Foote, 1989). En América también está presente *Bactrocera carambolae* Drew-Hamcock (“mosca de la carambola”), esta especie es originaria de la Región Oriental y fue introducida a través del norte de América del sur (Malavasi *et al.*, 1999).

Trypetinae es la subfamilia más diversa dentro de Tephritidae e incluye especies cuyas larvas se desarrollan en frutos, semillas, tallos, brotes, flores y agallas (Foote *et al.*, 1993). Esta subfamilia incluye tres géneros de

importancia económica y cuarentenaria a nivel mundial, tales como *Anastrepha* Schiner, *Toxotrypana* Gerstaecker y *Ragoletis* Loew (Foote *et al.*, 1993; Aluja, 1993). Los dos primeros géneros constituyen la tribu Toxotrypanini, la cual está principalmente distribuída en la Región Neotropical (Norrbon *et al.*, 1999, 2000). *Anastrepha* se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Argentina (Norrbon y Foote, 1989). Hasta el momento para este género se han descrito más de 200 especies (Norrbon y Korytkowski, 2007), siete de ellas de importancia cuarentenaria. El género *Ragoletis* pertenece a la tribu Trypetini y está ampliamente difundido en las Regiones Paleártica, Holártica y Neotropical (Foote, 1981). En Argentina están presentes los tres géneros, pero solo *Anastrepha* incluye una especie de importancia económica, como es el caso de *A. fraterculus*, conocida vulgarmente como “mosca sudamericana de la fruta”. La mayoría de las especies de *Anastrepha*, *Toxotrypana* y *Ragoletis* no son de importancia económica y solo infestan plantas silvestres (Foote, 1981; Schliserman *et al.*, 2004; Norrbom, 2004). Entre otros géneros neotropicales presentes en Argentina y que solo se desarrollan en plantas sin valor comercial están *Rhagoletotrypeta* Aczél, asociada con plantas de la familia Ulmaceae (Norrbon, 1994; Ovruski *et al.*, 2005) y *Haywardina* Aczél, relacionada con especies de Solanaceae (Norrbon, 1994).

Las especies de la subfamilia Tephritinae se desarrollan en su mayoría en tallos, capítulos y más raramente en hojas y raíces de plantas compuestas (Asteraceae) (Gandolfo, 2004), por lo tanto esta subfamilia no forma parte del grupo de tefrítidos denominados “moscas de la fruta”.

## 2.2. Importancia Económica

Desde el punto de vista económico, el daño ocasionado por las especies de tefrítidos plaga de la frutihorticultura mundial puede ser directo o indirecto (Aluja, 1994). En el primer caso, el daño se produce debido al ataque directo al fruto, ya que las hembras, previamente copuladas, oviponen en el interior del mismo y las larvas a medida que crecen se alimentan de la pulpa.

Esto ocasiona una rápida putrefacción del área afectada, lo cual produce la temprana caída del fruto al suelo (Guillén y Sánchez, 2007). Así, las larvas salen del fruto, se entierran y se transforman en pupas. Después de un período variable, de acuerdo a la especie y condiciones ambientales, emergen los adultos reiniciando el ciclo en el área cultivada. En el segundo caso, se incluyen las limitaciones en la comercialización de los frutos por restricciones cuarentenarias de países importadores y, además, los efectos nocivos de plaguicidas no selectivos usados para el control de estos insectos plaga sobre el medio ambiente (Guillén y Sánchez, 2007).

*Ceratitis capitata* y *A. fraterculus* están consideradas entre las principales plagas insectiles de importancia económica y cuarentenaria de la frutihorticultura de Argentina (Guillén y Sánchez, 2007). *Ceratitis capitata* fue introducida en Argentina a principios del siglo XX, probablemente vía Buenos Aires, donde se la encontró infestando cultivos de durazno en 1905 (Vergani, 1952) o bien se introdujo naturalmente desde Brasil (González, 1978). Esta especie exótica ha logrado proliferar en las regiones donde hay disponibilidad de frutos susceptibles a su ataque, distribuyéndose de esta manera en casi todo el territorio Argentino, desde los 22° hasta los 56° de latitud sur (Vera *et al.*, 2002; Ovruski *et al.*, 2003).

La distribución de *A. fraterculus* en Argentina está limitada a las regiones con clima subtropical a templado cálido, siendo muy abundante en la región noroeste desde los 22° hasta los 33° de latitud sur, abarcando las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y La Rioja y en la región noreste desde los 25° hasta los 34° de latitud sur incluyendo las provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos; y ocasionalmente también puede encontrarse en otras provincias del país, como resultado de introducciones esporádicas de frutos infestados (Ovruski *et al.*, 2003; Ovruski y Schliserman, 2012).

Hasta el momento, las únicas especies de tefrítidos de importancia cuarentenaria registradas en Argentina son *C. capitata* y *A. fraterculus*

(Spinetta, 2004). Entre las especies de *Anastrepha* sin importancia económica citadas para Argentina se encuentra *A. schultzi* Blanchard (Blanchard, 1961). Esta especie de tefrítido ha sido reiteradamente capturada en el noroeste argentino y se descubrió que las larvas se desarrollan principalmente en frutos de la especie nativa *Juglans australis* Grisebach, sin valor económico, y menos frecuentemente en la especie exótica *Psidium guajava* L., también sin importancia comercial en el país (Schliserman *et al.*, 2004).

*Anastrepha fraterculus* y *C. capitata* causan pérdidas anuales significativas a la fruticultura nacional y son una de las principales limitaciones para la expansión de ésta actividad. La producción anual del país se ve afectada entre un 15 y un 20 %, por la acción conjunta de estas dos especies plaga, lo cual representa una pérdida de U\$\$ 37-50 millones por año. La región del NEA, es la zona frutícola más afectada por “moscas de la fruta”, se extiende desde Monte Caseros (provincia de Corrientes) a Colón (en la provincia de Entre Ríos) (SENASA, 2012a; Guillén y Sánchez, 2007).

A estas pérdidas se suman las causadas por la disminución en la calidad de los frutos, y los riesgos y consecuencias relacionados al uso de plaguicidas, como ser intoxicaciones, contaminación ambiental y aparición de nuevas plagas. Además, la sola presencia de estos insectos en las regiones frutihortícolas del país representa una limitante para la exportación de fruta fresca debido a las restricciones cuarentenarias impuestas por países importadores como Japón y Estados Unidos (Ovruski *et al.*, 2003).

### 2.3. Plaga-Agroecosistema

Entre las principales regiones de importancia frutihortícola de Argentina se encuentra el noroeste argentino, región que se destaca por el gran auge de la citricultura, logrando una producción anual de 2,5 millones de toneladas de frutos (Fogliata *et al.*, 2000). Solamente, en la provincia de Tucumán hay 29.500 ha. de limón, 3.120 ha. de naranjo agrio y dulce, 590 ha. de mandarina, 505 ha. de pomelo y 17 ha. de lima (García e Ivaldi, 2000). El desarrollo

agrícola y el avance de asentamientos humanos en esta y otras regiones produjeron la deforestación de la vegetación nativa, provocando una transformación y degradación de los ecosistemas naturales. De esta manera, el paisaje adquiere un aspecto de mosaico, el cual se manifiesta a través de la combinación de ecosistemas locales, o porciones de tierra con diferentes historias de uso que se repiten en forma similar a lo largo de una cierta distancia (Forman, 1997). Ejemplos de estos diferentes sistemas que conforman el mosaico serían bosques secundarios, urbanizaciones, huertas familiares y cultivos extensivos. Así, es común encontrar en la periferia de los cultivos extensivos del sector occidental de la provincia de Tucumán, áreas de selva con diferentes grados de alteración e historias de uso y abandono (Grau y Aragón, 2000). Estas áreas de vegetación silvestre corresponden al sector austral de la selva de “Las Yungas” que cubre principalmente la porción pedemontana de la ladera oriental de la sierra de San Javier en la provincia de Tucumán (Grau y Aragón, 2000).

Las plantas representan para los insectos mucho más que recursos tróficos, tanto para las especies relacionadas directamente con aquellas (herbívoros) como para otras especies de un ecosistema (depredadores, parásitos y detritívoros) (Schoonhoven *et al.*, 1998). En las plantas los insectos fitófagos (como las “moscas de la fruta”) no sólo consiguen alimento, sino también refugio contra condiciones climáticas extremas, protección frente a sus enemigos naturales, sitios para el cortejo, apareamiento, oviposición, descanso e hibernación (Strong *et al.*, 1986). Las comunidades vegetales pueden entonces considerarse como el marco o hábitat donde los insectos desarrollan sus ciclos biológicos, y ese marco posee una estructura que lo define (Southwood, 1978). El efecto de la estructura del hábitat puede abarcar diferentes escalas, desde una planta hasta el nivel de paisaje (Lawton, 1983). La estructura del hábitat también sería importante en la dinámica de las especies plagas y de sus enemigos naturales, ya que la distribución y abundancia de plantas hospederas o de la vegetación silvestre circundante a los cultivos más la distribución de los recursos esenciales (alimento, refugio y

sustrato de oviposición) influye en el comportamiento, distribución y abundancia de estos insectos (Aluja y Birke, 1993). En el caso puntual de los enemigos naturales, como por ejemplo los himenópteros parasitoides, la mayor complejidad del hábitat aumenta las alternativas de obtención de refugio y alimento (huéspedes alternativos, polen y néctar), ante lo cual se incrementa la abundancia de estos insectos benéficos (Marino y Landis, 1996).

Cuando se discute sobre la interacción insecto-hábitat, es importante reconocer dos rasgos distintivos del hábitat: a) nivel de fragmentación, el cual involucra la separación de parches (áreas que internamente presentan una homogeneidad relativa, que difiere de su entorno) (Forman, 1997) por regiones con condiciones ambientales relativamente inapropiadas; b) heterogeneidad, la cual involucra la existencia de dos o más tipos de parches con diferencias cualitativas (Addicot *et al.*, 1987). Según Lawton (1987), los principales parámetros de la estructura del hábitat serían la diversidad de especies vegetales, su distribución y su arquitectura, siendo también importante la permanencia en el tiempo de este esquema estructural.

Para lograr el éxito de los programas de control de “moscas de la fruta” en las distintas regiones frutihortícolas del país, es necesario enfocar el problema en su forma integral, prestando más atención a la ecología de estos insectos en ambientes naturales y alterados, los cuales actúan como multiplicadores de la plaga para futuras infestaciones en áreas cultivadas. Estos estudios favorecerán la utilización de métodos de control biorracionales (Aluja, 1999), los cuales no tienen efectos negativos sobre el medioambiente, como por ejemplo el control biológico y cultural.

#### **2.4. Manejo Integrado de “Moscas de la Fruta” en Argentina**

En Argentina, juntamente con *A. fraterculus* y *C. capitata*, existen varias especies de las plagas cuarentenarias que atacan frutales, de las cuales podemos citar a *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), que es de gran importancia económica, y ataca los frutos de pepita como manzana, pera,

membrillo y nogal, de las regiones de cuyo y del noroeste argentino (SENASA, 2006). *Pseudococcus viburni* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae), presente en frutales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Cichón *et al.*, 2011) y *Quadraspidiotus perniciosus* (Comstock) (Hemiptera: Diaspididae), que es una plaga de importancia económica en varias especies de *Prunus* sp principalmente y con nivel de tolerancia cero para algunos importadores, como Estados Unidos y la Comunidad Económica Europea (Cichón y Garrido, 2012).

Para el control de las “moscas de la fruta” se puso en marcha desde la década de 1990, el Programa Nacional de Control y Erradicación de Moscas de la Fruta (ProCEM Nacional) perteneciente al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, Resolución 134/1994 (SENASA, 1994). Este programa se ha basado en el uso integrado de la técnica del insecto estéril (TIE), el control cultural, biológico y químico, y un sistema de cuarentena estricta (Ovruski y Schliserman, 2012).

Para un mejor funcionamiento del programa se sectorizó el país en regiones, a saber, a) Cuyo y Patagonia, donde *C. capitata* se encuentra presente en las provincias de San Juan, Mendoza, Neuquén y Río Negro, mientras que *A. fraterculus* se encuentra en la provincia de La Rioja. b) Noroeste y Noreste, que abarca las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán y Catamarca y las provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos, respectivamente. En estas regiones se cultivan principalmente cítricos, y *C. capitata* y *A. fraterculus* causan pérdidas significativas (Guillén y Sánchez, 2007).

En el país ya existen regiones dentro del ProCEM Nacional que se encuentran libres de “moscas de la fruta” como ser La Patagonia y en la provincia de Mendoza, Malargüe y los Valles de Uco y El Sosneado. Además existen áreas de baja prevalencia en el resto de Mendoza y el Valle del Bermejo en la provincia de La Rioja, y zonas bajo control en el resto de las provincias de La Rioja y San Juan (Guillén y Sánchez, 2007). En las zonas

productoras de cítricos de las regiones del NOA y NEA, ambas plagas son controladas mediante la aplicación de insecticidas químicos, por aire y por tierra, siendo perjudiciales para el hombre y medioambiente. A pesar de la aplicación de insecticidas, se registran altos niveles de fruta dañada, lo que demuestra la necesidad de abordar este problema con un enfoque integrado para el control de la “mosca de la fruta” en toda la región (Quiroga *et al.*, 2010). Debido a lo mencionado anteriormente, los tratamientos, que se realizan en el marco del ProCEM NEA, están reglamentados por la emergencia fitosanitaria declarada en la región mediante la Resolución SENASA 874/2011 y su prórroga, Resolución SENASA 388/2012, que establece la obligatoriedad del control de la plaga mediante la realización de tratamientos fitosanitarios aéreos con spinosad (insecticida neurotóxico que actúa sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolinesterasa y sobre los receptores GABA), continuar con sus habituales tratamientos de control químico con el insecticida mercaptotion (organofosforado), recolección semanal tanto de los frutos caídos y remanentes de cosecha y enterrarlos a no menos de 30 cm de profundidad y erradicar los montes abandonados o donde no se realice aprovechamiento comercial de la fruta (SENASA, 2012a,b; INTA, 1996).

## 2.5. Hongos Entomopatógenos

El control de plagas utilizando entomopatógenos (bacterias, hongos, virus, protozoos y nematodos) es conocido como control microbiano (Alves y López, 2008). Los hongos son el segundo grupo de organismos más grande del mundo, después de los insectos. Éstos participan en todos los procesos biológicos, adquiriendo un rol vital en la evolución de la vida terrestre, en la dinámica de los ecosistemas y el mantenimiento de la biodiversidad (Hawksworth, 1991). Ha sido reconocido su potencial como agentes de control biológico, al constituir un grupo con más de 750 especies de casi 100 géneros (Vega y Blackwell, 2005) que pueden infectar a diferentes grupos de insectos y otros artrópodos, como arañas y ácaros (Boucias y Pendland, 1998). La

mayoría de estos hongos pertenecen a los Phyla Ascomycota y Entomophthoromycota, dentro del Reino Mycota (Murrin, 1996; Hajek y Dellalibera, 2010; Humber 2012), se encuentran comúnmente en la naturaleza (Deshpande, 1999; Milner, 2000) infectando los estados inmaduros (larvas o ninfas) y adultos de los órdenes Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera (Tanada y Kaya, 1993).

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

Dentro del Phylum Entomophthoromycota, Orden Entomophthorales, se incluyen más de 200 especies patógenas, las cuales generan epizootias en hemípteros, lepidópteros, ortópteros y dípteros. Los hongos de este orden se caracterizan por presentar hifas no septadas y son de reproducción asexual y sexual. La reproducción sexual ocurre por la formación de conidios primarios, los cuales germinan y penetran en el insecto, pudiendo originar conidios secundarios y terciarios. Dentro del insecto producen cuerpos hifales y, si las condiciones no son favorables, forman esporas de resistencia. Además, tienen

la característica de emitir rizoides que fijan el insecto al sustrato vegetal. Los principales géneros de Entomophthorales son: *Conidiobolus*, *Zoophthora*, *Pandora*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Neozygites* (Papierok y Hajek, 1997; Humber, 1997; Benny *et al.*, 2001; Hibbett *et al.*, 2007; Sosa-Gómez *et al.*, 2010).

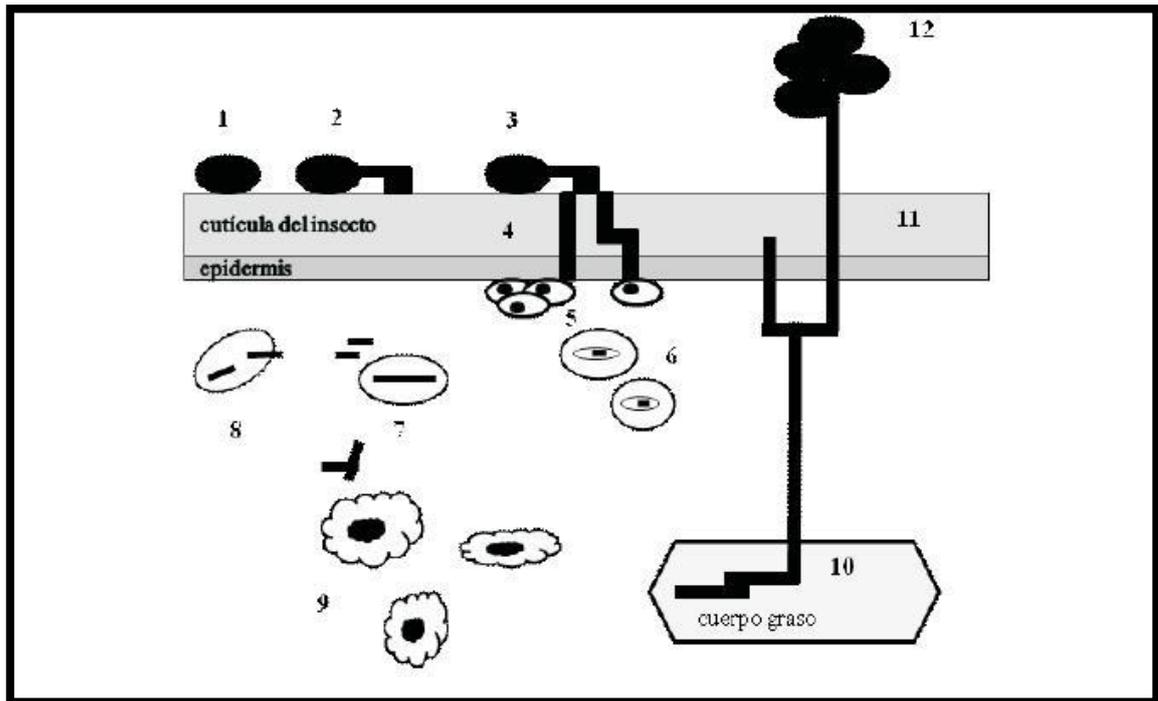
## 2.6. Interacción Patógeno-Huésped

Los hongos entomopatógenos son de gran importancia dentro de los agroecosistemas por su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos, la cual depende de la susceptibilidad del hospedero o de la asociación patógeno-huésped. En este último caso, el insecto huésped puede ejercer una presión de selección que favorezca a pocos genotipos del patógeno; es decir, hay una selección natural de estos microorganismos en términos de especialización con respecto al huésped (Maurer *et al.*, 1997; St. Leger y Roberts, 1997).

Para que la manifestación epizootica de los hongos entomopatógenos tenga lugar, los factores bióticos y abióticos tienen una enorme influencia. Entre los factores abióticos que afectan la viabilidad y la persistencia de los hongos entomopatógenos en el campo se encuentran la luz ultravioleta, la temperatura, la humedad relativa y los agroquímicos, principalmente los fungicidas. 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 de los entomopatógenos tienen requerimientos específicos de agua 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).

## 2.7. Mecanismo de Acción de los Hongos Entomopatógenos

Los hongos por lo general penetran en el insecto a través de su cutícula externa, actuando como insecticidas de contacto y su mecanismo de acción se puede dividir en las siguientes etapas:



Esquema del mecanismo de acción y desarrollo de un hongo entomopatógeno (modificado de Vilcinskas y Götz, 1999).

### 1) Adhesión de las esporas a la cutícula del hospedero y germinación de la espora

El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la espora del primero es depositada en la superficie de este último. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interfase entre la espora pregerminada y la epicutícula y finalmente, la

germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración (Tanada y Kaya, 1993; Pedrini *et al.*, 2007). La germinación de los conidios origina un tubo germinativo y, en algunos casos, la formación de un apresorio que está relacionada con la capacidad de penetrar la cutícula de los insectos, debido a la presión mecánica o a una actividad enzimática en el ápice del mismo (Murrin, 1996). La presencia del apresorio se demostró *in vitro* e *in vivo* en diferentes hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, *I. farinosa* y *M. anisopliae* (Lecuona, 1996). El resultado de la germinación y la penetración no depende necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, la agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedador (Samson *et al.*, 1988; Shapiro *et al.*, 2005).

## 2) Penetración del tegumento

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. Paralelamente, 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). Estudios *in vitro* demostraron que la digestión del tegumento del insecto es llevada a cabo por esterasas y proteasas en las primeras 24 horas de la infección, seguido de la actividad de quitinasas y quitobiasas en el tercer día, y finalmente, la acción de las lipasas a partir del quinto día (Tanada y Kaya, 1993; St. Leger, 1986).

## 3) Multiplicación del hongo en el hemocele y muerte del insecto

Una vez dentro del insecto, la mayoría de los hongos entomopatógenos se multiplican por gemación, dando formas miceliares unicelulares llamadas blastosporas (en Ascomycota), cuerpos hifales (en Entomophthorales) o protoplastos, que se multiplican e invaden diversas estructuras como tejidos

musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, hemocitos, retículo endoplásmico y membrana nuclear (Samson *et al.*, 1988; Murrin, 1996; Boucias y Pendland, 1998; Pucheta Diaz *et al.*, 2006). Estas estructuras fúngicas evitan la defensa inmune del insecto ya que no son reconocidas por la población de hemocitos del insecto (Tanada y Kaya, 1993). La muerte del insecto puede ocasionarse por la secreción de sustancias tóxicas denominadas micotoxinas (en Ascomycota) o por la depleción de los nutrientes de la hemolinfa y la invasión completa de los tejidos del insecto (en Entomophthorales) (Tanada y Kaya, 1993; Murrin, 1996; Boucias y Pendland, 1998). La muerte del insecto se produce con mayor rapidez cuando este es afectado por un hongo que produce cantidades considerables de toxinas, ya que se adiciona la toxemia a la destrucción de los tejidos y a las deficiencias nutricionales. Los individuos enfermos no se alimentan, presentan debilidad, desorientación y cambian de color, presentando manchas oscuras sobre el tegumento, que corresponden con las esporas germinadas del hongo (Alean Carreño, 2003; Cañedo y Ames, 2004; Giraldo, 2009).

El tiempo que demanda la muerte del insecto dependerá del hongo entomopatógeno, del insecto hospedador y de los factores ambientales (Lecuona, 1996).

#### 4) Emersión del hongo, esporulación y dispersión de los propágulos infectivos

Después de la muerte del insecto, si las condiciones ambientales no son favorables, el hongo permanece en el interior del insecto y el tegumento se mantiene intacto. Sin embargo, si las condiciones de humedad relativa son altas, las estructuras fúngicas logran atravesar nuevamente el tegumento para emerger hacia el exterior del insecto. Generalmente, la emersión del hongo ocurre por regiones menos esclerosadas de la cutícula, como las membranas intersegmentales o los espiráculos (Lecuona, 1996). Si las condiciones de humedad relativa son altas, las hifas presentes en el exterior del insecto producen esporas dentro de las 24 a 48 horas. La dispersión de los propágulos

infectivos (esporas o conidios) se realiza a través del viento, suelo, la lluvia e incluso insectos enfermos al entrar en contacto con otros sanos (Giraldo, 2009). La dispersión de las esporas o conidios depende de las características de la espora y del esporangio, siendo un proceso activo en los hongos Entomophthorales o pasivo en los hongos Ascomycota (Tanada y Kaya, 1993; Shah y Pell, 2003).

## **2.8. Ocurrencia Natural de Hongos Entomopatógenos en “Moscas de la Fruta”**

Aunque las infecciones epizooticas de “moscas de la fruta”, por hongos entomopatógenos en la naturaleza son poco frecuentes y las tasas de infecciones naturales también tienden a ser bajas, se reportó la infección natural en adultos de *C. capitata* por *Entomophthora muscae* y *E. schizophorae* en Israel (Uziel *et al.*, 2003). También se registró, en Costa Rica y Guatemala, la ocurrencia natural de *Stigmatomyces* spp. en *A. striata*, aunque no es considerada como un patógeno de insectos (Hedström, 1994). *Scopulariopsis brevicaulis* (Lipa *et al.*, 1976) ha sido reportado atacando puparios de *Rhagoletis alternata* en Costa Rica. *Isaria fumosorosea* y *Aspergillus ochraceus* fueron aislados de *Anastrepha* sp. y *C. capitata*, respectivamente (Castillo *et al.*, 2000). En Grecia fueron aislados los hongos *B. bassiana*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium aurantiogriseum* y *P. chrysogenum* de *Batrocera oleae* (Konstantopoulou y Mazomenos, 2005).

## **2.9. Manejo Integrado de “Moscas de la Fruta” a través de Hongos Entomopatógenos**

El objetivo del manejo integrado de plagas es reducir el empleo de plaguicidas de síntesis, complementándolo con otras estrategias tales como prácticas culturales y el uso de agentes naturales (depredadores, parásitos, parasitoides y patógenos) como controladores biológicos de insectos. Los

microorganismos patógenos que podrían ser utilizados en el control biológico de insectos son virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos (Alves 1998).

El manejo integrado de “moscas de la fruta” es ampliamente utilizado en Argentina y a nivel mundial (Ovruski y Schliserman, 2012) por ende la incorporación de hongos entomopatógenos como otra estrategia de control podría llegar a tener un papel importante a fin de hacer aún más eficiente el control de dichos fitófagos plaga. La mayoría de las investigaciones sobre el empleo de hongos se enfocan a ensayos experimentales en laboratorio (Carswell *et al.*, 1998; Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2000; De La Rosa *et al.*, 2002; Quesada-Moraga *et al.*, 2006; Sookar *et al.*, 2008; Cossentine, *et al.*, 2010; Hernández Días-Ordaz *et al.*, 2010; Dimbi, *et al.*, 2013; Imoulán y Elmeziane, 2013). Si bien la mayoría de estos estudios se muestran promisorios, pocos trabajos han sido realizados a gran escala o a nivel de campo (Ekesi *et al.*, 2007).

Para integrar el uso de hongos entomopatógenos en programas de control de “moscas de la fruta” se encuentran en evaluación tres métodos de aplicación a campo en África: a) Aplicación aérea dirigida a adultos: lo fundamental en la aplicación es compatibilizar el hongo con cebos alimenticios o cebos atrayentes en el caso de pulverizaciones. El principio básico de estos métodos de aplicación, es que las moscas puedan ingerir o recoger las esporas de la superficie de las hojas durante la alimentación (Ekesi *et al.*, 2007); b) Inoculación en suelo dirigida a larvas y pupas: el suelo es un importante reservorio para los hongos patógenos de insectos, y considerado un excelente ambiente para el uso de éstos como agentes de control biológico, debido a que su humedad es alta y estable y ofrece protección para la radiación ultravioleta y fluctuaciones de temperaturas extremas (Jackson *et al.*, 2000). A pesar de la presencia de estos hongos en los suelos, para un efectivo control de la población de la plaga, se requiere un aumento adicional de propágulos. Las “moscas de la fruta” pasan parte de su ciclo de vida en contacto con el suelo (larvas y pupas), lo que sugiere que la aplicación de hongos en este ambiente tiene potencial para su control (Jackson *et al.*, 2000;

Ekesi *et al.*, 2007); y c) Autodiseminación de moscas adultas: se ha propuesto la estrategia de autodiseminación de hongos entomopatógenos para insectos plaga que responden a estímulos

visuales y olfatorios. Esta estrategia consiste en atraer al insecto plaga mediante estímulos hacia puntos focales donde se encuentra el patógeno. El insecto recoge el inóculo en su cuerpo y lo disemina a otros individuos de la población (Maniania *et al.*, 2003).

### **2.10. Interacción hongos entomopatógenos-parasitoide**

Cuando parasitoides y hongos entomopatógenos utilizan la misma especie de insecto huésped, el solapamiento temporo-espacial de sus poblaciones puede resultar en una competencia directa por los recursos finitos del huésped. En tales situaciones, las interacciones patógeno-parasitoide pueden ocurrir a nivel individual como a nivel de la población (Furlong y Pell, 2005).

La biología única de los endoparasitoides implica que, a nivel individual, sus interacciones con los hongos patógenos pueden ocurrir en el interior del huésped, cuando un solo huésped es atacado por un parasitoide e infectado por un hongo patógeno, o externa al huésped, como en la infección directa de los adultos de vida libre por patógenos, transmisión directa de conidios a huéspedes susceptibles por parasitoides adultos, o alteración del comportamiento del huésped en presencia del parasitoide que pueden conducir a cambios en la epidemiología de la enfermedad (Lord, 2001).

Los hongos entomopatógenos y parasitoides representan un importante recurso para el manejo racional de muchas especies de plagas de insectos. Cada uno de estos grupos de enemigos naturales pueden ser determinantes de la estructura de la comunidad de insectos (Waage y Hassell, 1982; Anderson y May, 1986).

La comprensión de sus interacciones dentro de un sistema trófico es imprescindible para desarrollar desde el inicio programas eficaces de control biológico y para evitar el entorpecimiento de programas ya existentes mediante la introducción de otro tipo de enemigo natural (Furlong y Pell, 2005).

La seguridad del uso de hongos patógenos como agentes de control biológico ha sido a menudo motivo de preocupación primordial cuando las asociaciones entre los hongos entomopatógenos y enemigos naturales de artrópodos de insectos se han considerado (Goettel *et al.*, 1990; Vinson, 1990) y la única revisión para considerar las relaciones recíprocas entre parasitoides de insectos y hongos patógenos se publicó hace más de una década (Brooks, 1993).

**HIPÓTESIS**

1. Existen especies nativas de hongos entomopatógenos asociados a “moscas de la fruta” en el sector austral de Las Yungas (NOA) que pueden ser útiles para su empleo como agentes de control biológico contra las especies plaga *A. fraterculus* y *C. capitata*.
2. Existe un efecto aditivo entre un parasitoide nativo del sector austral de Las Yungas (NOA) y un hongo entomopatógeno aislado de un hospedero no-tefrítido, cuando son empleados en forma conjunta para la regulación de la población de la especie plaga *C. capitata*

**OBJETIVO GENERAL**

Se analizará la interacción entre especies nativas de hongos con sus hospederos *Anastrepha fraterculus* y *Ceratitis capitata*, en el sector austral de la selva de Las Yungas, provincia de Tucumán, teniendo en cuenta la permanencia de estas interacciones en el tiempo bajo condiciones naturales y el potencial de alguna de estas especies de hongos como posibles agentes de control biológico de ambas especies plaga. Asimismo, se evaluará un posible sinergismo en el control de estas plagas entre dos clases de enemigos naturales, un parasitoide nativo asociado a “moscas de la fruta” y una cepa de hongo aislada de un hospedero no-tefrítido.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Prospección, aislamiento e identificación de hongos patógenos asociados a especies de “moscas de la fruta” (*Anastrepha* spp. y *C. capitata*).

- 2) Determinar la incidencia y variación estacional de los hongos patógenos asociados con “mosca de la fruta” (*Anastrepha* spp. y *C. capitata*) en ambientes con frutos nativos y exóticos del sector austral de Las Yungas, y su correlación con factores bióticos (fenología de la planta hospedadora y densidad, nivel de infestación larval y estacionalidad de las moscas huéspedes) y abióticos (temperatura, régimen de lluvias, humedad relativa ambiental).
  
- 3) Determinar la patogenicidad sobre “moscas de la fruta” de los hongos patógenos aislados e identificados en el objetivo 1, como así también de otros hongos provenientes tanto de insectos hospedantes emparentados como de insectos no relacionados con dípteros tefrítidos.
  
- 4) Evaluar el sinergismo entre el parasitoide nativo del Neotrópico, *Coptera haywardi* Loíacono (Hymenoptera: Diapriidae) y el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill (Hypocreales: Clavicipitaceae) aislado de un hospedero no-tefrítido.

### 3. MATERIALES y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio

El área donde se realizó el estudio corresponde al sector austral de la Selva de Las Yungas argentinas, el cual está bajo protección y pertenece al Parque provincial “Sierra de San Javier” de la Universidad Nacional de Tucumán, situado a 15 km al oeste de la ciudad de San Miguel de Tucumán, Capital de la provincia. Esta sección corresponde a la ladera oriental de la Sierra de San Javier, cordón montañoso que discurre con rumbo norte-sur en una ubicación casi central en la provincia de Tucumán ( $26^{\circ} 38' - 26^{\circ} 57'$  latitud sur,  $65^{\circ} 6' - 65^{\circ} 20'$  longitud oeste), el cual está cubierto por selva subtropical de montaña perteneciente a la región fitogeográfica de Las Yungas (Dominio Amazónico) y bordeada por cultivos cítricos, palta y caña de azúcar. El área seleccionada para el estudio se encuentra en un rango altitudinal de 600-800 msnm y pertenece a la porción de Selva Montana Inferior del sector austral (Tucumán) de Las Yungas argentinas (Figura 1). Este tipo de ambiente permite una gran proliferación de las “moscas de la fruta”, fundamentalmente por la abundancia de frutas hospederas multiplicadoras como la guayaba, cuaresmillo, nogal criollo y diversas mirtáceas nativas (Ovruski *et al.*, 2003).

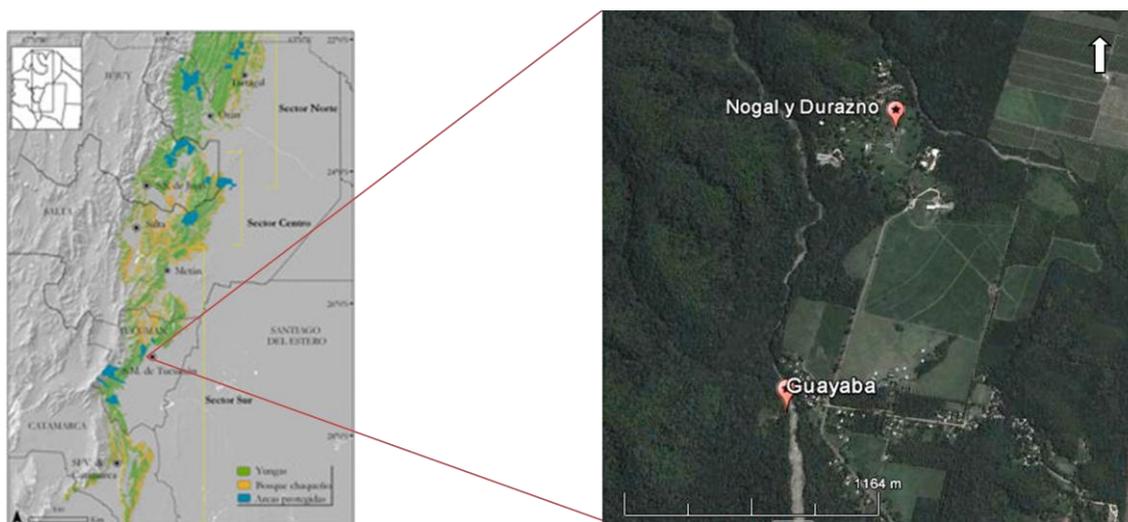


Figura 1. Área de muestreo

### 3.2. Recolección de material en campo

La recolección de “moscas de la fruta” se realizó a partir de *Juglans australis* Grisebach (nogal criollo), *Prunus persica* (L.) Batsch (durazno) y *Psidium guajava* L. (guayaba). Los muestreos se realizaron semanalmente durante el período de fructificación de los mismos. Al momento de la recolección se registraron los datos de temperatura y humedad relativa utilizando un termohigrómetro digital (TFA®, Alemania). Los datos climáticos de temperaturas y humedad relativa medias mensuales fueron proporcionados por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, estación El Colmenar, Tafí Viejo, Tucumán. En ambos casos estos datos fueron procesados para evaluar posteriormente posibles correlaciones con la presencia de hongos patógenos en los insectos.

Se seleccionaron 10 árboles de cada especie frutal, de los cuales se colectó semanalmente, frutos maduros y pupas enterradas en el suelo, procediéndose de la siguiente manera:

a) Frutos maduros: (Figuras 2 y 3) se colectaron 15 frutos maduros, caídos al suelo, por cada árbol seleccionado. Estos fueron transportados al laboratorio en bolsas plásticas, donde fueron pesados y colocados en cajones de plástico con el fondo en rejilla, para facilitar el escurrimiento de la fruta y cubiertos en su totalidad con tela voile. Diariamente fueron revisados para extraer las larvas del último estadio.

b) Pupas enterradas en el suelo: (Figuras 4 y 5) debajo de los frutos caídos, se realizaron excavaciones de hasta 5cm de profundidad para obtener aproximadamente 1320cm<sup>3</sup> (700 gr.) de suelo. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas de plástico. Posteriormente se extrajeron las pupas de las “moscas de la fruta”.



Figura 2. Campo. Fruta infestada caída al suelo



Figura 3. Laboratorio. Fruta en cajones de escurrimiento



Figura 4. Campo. Colecta de tierra



Figura 5. Laboratorio. Separado de pupas

### 3.3. Prospección en laboratorio del material colectado

Las larvas obtenidas de los frutos recolectados, así como las pupas extraídas de las muestras de suelo, fueron identificadas bajo lupa estereoscópica binocular (ARCANO), para determinar si correspondían a *C. capitata* o *A. fraterculus*, según Blanchard (1961) .

Los individuos vivos y muertos, separados de las muestras de tierra y fruta, fueron colocados en cámaras húmedas (cápsulas de Petri, conteniendo papel de filtro humedecido con agua destilada y dos portaobjetos en cruz, todo estéril) y mantenidas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y un fotoperiodo de 12:12 L:O, durante 10 días, para facilitar la expresión de posibles infecciones fúngicas, mediante el crecimiento de micelio. Antes de ser colocadas en cámaras húmedas, las larvas y/o pupas fueron lavadas y desinfectadas superficialmente mediante tres baños, de un minuto cada uno, de agua destilada estéril, hipoclorito de sodio al 0,5% y agua destilada estéril, luego fueron colocadas en papel de filtro para retirar el exceso de agua. Cuando se manifestó la infección en forma de micelio externo, éste fue retirado con un ansa estéril y sembrado en cápsulas de Petri de 90x20mm con medio de cultivo Sabouraud dextrosa agar con extracto de levadura al 0,25% (SDYA  $\frac{1}{4}$ ) sin antibiótico (Figuras 6, 7 y 8).

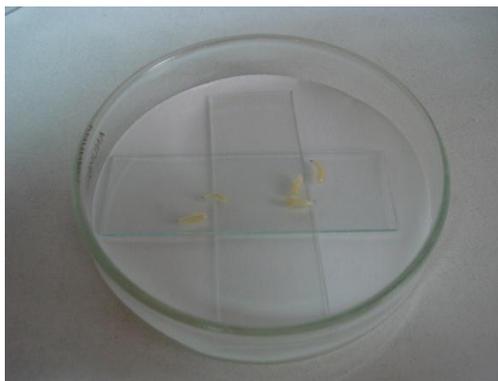


Figura 6. Larvas en cámara húmeda



Figura 7. Larva infectada



Figura 8. Aislamiento

### 3.4. Métodos de aislamiento y preservación de hongos entomopatógenos

Para realizar los aislamientos de los hongos entomopatógenos en cultivos *in vitro* se utilizó el método del Aislamiento Directo (Alves 1998). Para ello se tomó a partir de un insecto infectado, micelio y conidios con un ansa estéril y se inoculó en una cápsula de Petri de 90x20mm conteniendo medio de cultivo SDYA  $\frac{1}{4}$ , en tres puntos equidistantes. Las cápsulas fueron incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  bajo un fotoperíodo de 12:12 L:O, hasta su esporulación. Posteriormente, para ser conservados, los conidios fueron transferidos, mediante la utilización de un ansa bacteriológica, a tubos con medio de cultivo SDYA  $\frac{1}{4}$  en “pico de flauta” y a crioviales conteniendo 2ml de agua destilada estéril. También se procedió al secado de conidios, para ello se llenaron crioviales en sus  $\frac{3}{4}$  partes con gránulos de sílica gel estéril (Cicarelli®, sin

indicador). Se preparó una suspensión conocida de conidios, con agua destilada estéril, que se colocó en sílica gel en una proporción de 0,5ml/4g de sílica gel y fueron dejados en un ambiente seco durante 15 días a 25°C. Los cultivos en “pico de flauta” y los crioviales con agua destilada estéril y sílica gel con conidios fueron conservados a 4°C hasta su utilización.

Todo el material utilizado fue esterilizado en autoclave tipo Chamberland a 120°C y 1 atm. de presión durante 20 minutos. Los aislamientos y transferencia de conidios fueron realizados en condiciones de esterilidad, bajo cámara de flujo laminar horizontal (LABCONCO®. Purifier™ ClassII safety cabine) (Figuras 9 y10).



Figura 9. Conservación en medio SDYA ¼



Figura 10. Conservación en agua destilada y sílica gel

### 3.5. Selección de cepas patógenas de “moscas de la fruta”

La selección de las cepas patógenas contra las “moscas de la fruta”, fue realizada mediante los Postulados de Koch (Castillo, 2007). Para la realización de ellos, se repicó a partir de un cultivo puro, en cápsulas de Petri de 90x20mm con medio SDYA  $\frac{1}{4}$ , los hongos aislados en el presente trabajo de tesis. Se encubaron durante 15 días a 25°C, con un fotoperiodo de 12:12, L:O. Pasado este tiempo se separaron 20 larvas L3 de *A. fraterculus*, en capsulas de 50x15mm, por cada cepa a ser probada (Figura 11).

Las larvas fueron colocadas directamente sobre el cultivo, durante 1 minuto, y devueltas a las mismas cápsulas de Petri, durante 24hs, hasta su pupación (Figura 12). Pasado este tiempo se pasaron a cámaras húmedas, para facilitar el crecimiento externo de micelio, en los casos donde haya ocurrido la infección. Larvas y pupas se mantuvieron en cámaras acondicionadas a 25°C, con un fotoperiodo de 12:12, L:O.

A partir del insecto infectado, se extrajo micelio y conidios con un ansa estéril y se inocularon en una cápsula de Petri de 50x15mm, conteniendo medio de cultivo SDYA  $\frac{1}{4}$ , y se incubó bajo las condiciones mencionadas más arriba, durante 15 días. La confirmación de la mortalidad debido a la especie inoculada fue realizada mediante la visualización del material fúngico en preparados microscópico, bajo microscopio óptico con contraste de fases (Boeco Germany).

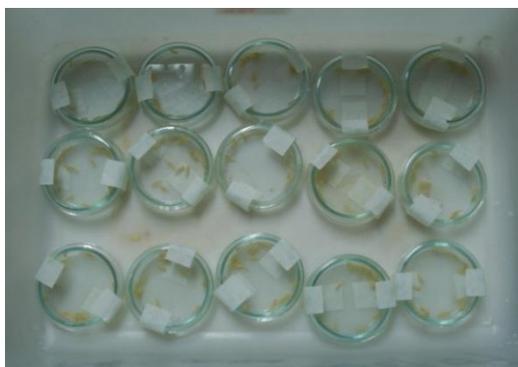


Figura 11. Larvas de *A. fraterculus*



Figura 12. Larvas sobre el cultivo

### **3.6. Identificación, caracterización morfológica y fisiológica de las cepas de *Beauveria bassiana* nativas de Las Yungas**

#### **3.6.1. Identificación y caracterización morfológica de las cepas de *B. bassiana***

El primer paso fue establecer la identificación de las especies de hongos mediante la utilización de la clave propuesta por Humber (1997). Adicionalmente se realizaron observaciones del aspecto y color de la colonia, pigmento en el medio de cultivo, formación de sinemas y tamaño de la colonia.

En todos los casos el material utilizado se esterilizo en autoclave tipo Chamberland a 120° C y 1 atm. de presión, durante 20 minutos. Todas estas tareas fueron realizadas en condiciones de esterilidad, bajo cámara de flujo laminar horizontal (LABCONCO®. Purifier™ ClassII safety cabine) (Figura 13).



Figura 13. Cámara de flujo laminar horizontal

### 3.6.1.1 Morfología macroscópica

Para realizar la caracterización macroscópica se sembraron con una aguja estéril, cada una de las cepas del hongo, cápsulas esterilizadas de 100 mm de diámetro con medio de cultivo SDYA  $\frac{1}{4}$ , se incubaron a 25°C durante 15 días con un fotoperiodo de 12:12 L:O. Se realizaron observaciones del color de la colonia, aspecto, superficie y crecimiento. Además se observó si hubo pigmentación del medio por parte del hongo.

### 3.6.1.2. Morfología microscópica

La morfología microscópica consistió en determinar el tamaño de los conidios. Con la ayuda de una pipeta se tomó una alícuota de la suspensión de conidios para cada una de las cuatro cepas de *B. bassiana*. Las alícuotas se colocaron en un portaobjeto y se cubrió con un cubreobjeto. Estas se observaron, bajo aceite de inmersión, con un objetivo 100x, bajo microscopio óptico con contraste de fases (Boeco Germany) y los conidios fueron medidos con un ocular micrométrico. Se midió el diámetro mayor y el diámetro menor de 20 conidios, los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de 0.05. La comparación entre medias fue

realizada mediante el Test de Tukey a un nivel de significancia de 0.05, utilizándose el programa StatSoft, Inc. versión 7 (2004).

### **3.6.2. Caracterización fisiológica de las cepas de *B. bassiana***

La caracterización fisiológica se realizó mediante la evaluación de los parámetros utilizados en el control de calidad de las formulaciones de hongos entomopatógenos: porcentaje de germinación, producción de conidios y crecimiento radial.

#### **3.6.2.1. Porcentaje de germinación (viabilidad)**

Para determinar el porcentaje de germinación de los conidios se utilizaron 3 cápsulas de Petri de 90x20mm por cada aislamiento, conteniendo dos portaobjetos de vidrio y un disco de papel de filtro humedecido con agua destilada (Figura 14). Bajo cámara de flujo laminar vertical se colocaron 500µl de medio SDYA  $\frac{1}{4}$  sobre el portaobjetos superior. El medio de cultivo fue distribuido uniformemente e inoculado con 100µl de una concentración de  $1 \times 10^4$  conidios/ml. La concentración fue determinada mediante el conteo de conidios en cámara de Neubauer. El porcentaje de germinación se calculó contando 200 conidios (de los cuales se estimaron germinados y no germinados) dos veces para cada cápsula, luego de 24 horas de incubación a 25°C y 12:12 L:O, adaptado de Lane *et al.* (1988).

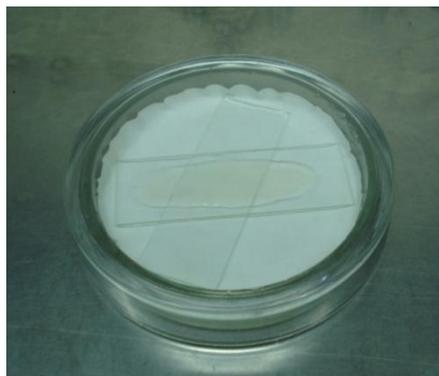


Figura 14. Cápsula de germinación

### 3.6.2.2. Producción de conidios (esporulación)

Se inocularon 20  $\mu\text{l}$  de una suspensión de conidios con una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/ml en placas de Petri de 90x20mm con medio SDYA  $\frac{1}{4}$  diseminándose en toda la superficie del medio con la ayuda de un ansa de Drigalsky esterilizada. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 15 días con un fotoperiodo de 12:12 L:O. Para la preparación de la suspensión se raspó la superficie del cultivo, con un ansa esterilizada, y se colocó en 10ml de agua destilada más Tween 80 (polisorbato de sodio) 0,01% y a partir de esta suspensión madre se realizaron diluciones sucesivas en un factor de 0.1. El conteo de conidios por mililitro se hizo en una cámara de Neubauer (Figura 15) y se realizaron cinco repeticiones por cepa.



Figura 15. Cámara de Neubauer

### 3.6.2.3. Crecimiento radial. Tasa de crecimiento

La evaluación del crecimiento radial se efectuó de acuerdo a la metodología seguida por Varela y Morales (1996) y Vélez *et al.*, (2000). En el centro de una capsula de Petri de 150x30mm, conteniendo medio SDYA  $\frac{1}{4}$ , se inocularon 10  $\mu$ l de una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidios/ml, que fue diseminando en toda la superficie, con la ayuda de un ansa de Drigalsky esterilizada. A partir del tercer día de sembrado se midió con una regla milimetrada, el radio mayor y el menor partiendo del centro de la colonia. Se realizaron 10 repeticiones por cepa, las mediciones se registraron diariamente durante 10 días a partir del tercer día. Con el radio mayor y menor se determinó el radio promedio en cada día para cada cepa (Figura 16).

Se determinó el diámetro de la colonia a los 10 días. La tasa de crecimiento se estimó mediante la siguiente fórmula:

Tasa de crecimiento diaria = (diámetro final – diámetro inicial)/ número de días

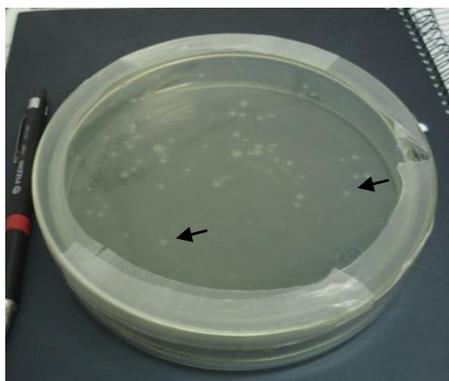


Figura 16. Placa con colonias (flechas)

#### 3.6.2.4. Análisis estadístico

La producción de los conidios, el porcentaje de germinación, el crecimiento radial y la tasa de crecimiento fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de 0.05. La comparación entre medias fue realizada mediante el Test de Tukey a un nivel de significancia de 0.05, utilizándose el programa InfoStat, versión 2008.

#### 3.7. Mantenimiento de la cría artificial de *A. fraterculus* y *C. capitata*

Las crías artificiales de las especies de especies de “moscas de la fruta” se mantuvieron en el Laboratorio de Investigaciones Ecoetológicas de Moscas de la Fruta y sus Enemigos Naturales (LIEMEN), perteneciente a la División de Control Biológico de PROIMI-Biotecnología-CONICET, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

La cría de adultos de *A. fraterculus* se realizó en jaulas de aluminio de 100x70x20cm de alto, ancho y profundidad (Figura 17). En una de sus caras de mayor área presentaba tela de voile para facilitar la aireación, y en la otra una unidad de oviposición (UO), que consistió en un panel de tela de voile cubierta con una capa uniforme, de aproximadamente 5 mm, de sellador sintético transparente de silicona (Fastix®), la cual estaba cubierta con una plancha de goma espuma humedecida y plástico, para evitar la desecación de los huevos. Los huevos fueron recogidos en agua mineral con una esponja, y posteriormente sembrados en una dieta artificial a base de levadura, germen de trigo, azúcar, vitaminas y minerales, para el desarrollo de las larvas (Figura 18). Luego que las larvas alcanzaron su último estadio (L3), fueron recolectadas y colocadas en recipientes con vermiculita como medio de pupación. Antes de la emergencia de los adultos los recipientes con pupas fueron colocados en las jaulas descriptas arriba.

Figura 17. Jaulas de adultos de *A. fraterculus*

Figura 18. Dieta artificial de larvas

Los adultos de *C. capitata* se criaron en jaulas de acrílico de 30x30x30cm con dos ventanas de tela de voile de 15cm diámetro, para la aireación (Figura 19). Como UO se utiliza la parte redondeada de maracas de plástico color amarillo, a las cuales se les realizaron perforaciones con una aguja hipodérmica para facilitar la oviposición. Estas fueron llenadas con  $\frac{1}{4}$  de agua mineral de consumo humano, para evitar la desecación de los huevos. Los huevos fueron sembrados y las larvas colectadas como se explicó más arriba.

Los adultos de ambas especies fueron provistos con agua y dieta artificial a base de levadura hidrolizada enzimática, hidratos de carbono, vitaminas, sales y conservantes. Los adultos, larvas y pupas fueron mantenidos en una cámara de cría acondicionada a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5$  HR y fotoperíodo de 12:12 L:O.

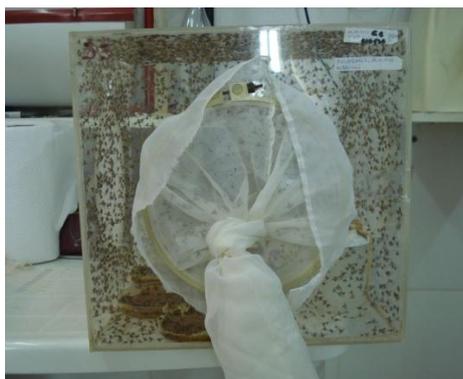


Figura 19. Jaula de adultos de *C. capitata*

### **3.8. Evaluación de la incidencia y variación estacional de las infecciones fúngicas en *Anastrepha fraterculus* y *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) en Guayaba, Durazno y Nogal**

Con el objetivo de evaluar la incidencia y variación estacional de las infecciones naturales causadas por los hongos entomopatógenos sobre *A. fraterculus* y *C. capitata*, se hizo un seguimiento de guayaba, nogal y durazno, en los 3 años de muestreo, durante sus periodos de fructificación. El seguimiento de las tres especies frutales fue debido a que sus periodos de fructificación van desde los meses de diciembre a mayo, excepto febrero. Los periodos para el durazno y nogal fueron en diciembre-enero de 2007-2008, 2008-2009 y 2009-2010 y para la guayaba fueron marzo-abril de 2008 y 2009 y marzo-mayo de 2010. Se seleccionaron 10 árboles frutales por especie, y para los muestreos se procedió como se explica en las secciones “**Recolección de**

**material en campo” y “Prospección en laboratorio del material colectado”.**

Se registró el número medio de puparios de *A. fraterculus* y *C. capitata* por muestra de tierra (volumen promedio ( $\pm$  error estándar de la media) de cada muestra =  $1.301,9 \pm 0,4 \text{ cm}^3$ ) como así también el porcentaje medio de puparios infectados con hongos. Además, se registró en número medio de larvas de *A. fraterculus* y *C. capitata* colectados por muestras de fruta colectadas del suelo (peso promedio ( $\pm$  error estándar de la media) de cada muestra =  $494,9 \pm 25,47 \text{ grs}$ ) y el porcentaje medio de larvas infestadas con hongos.

Se calculó la Incidencia acumulada (IA) (Freeman y Hutchinson, 1980) de los hongos entomopatógenos, que es la proporción de individuos sanos que desarrollaron infecciones a lo largo del período de estudio. Se calculó con la siguiente fórmula:

$$IA (\%) = (N^\circ \text{ de ind infect durante el seguimiento} / \text{Total de ind}) \times 100$$

### **3.8.1. Análisis estadístico**

El porcentaje de larvas/puparios infectados con hongos fue analizado estadísticamente mediante análisis de varianza y pruebas *t* de Student a un nivel de significancia igual a 0.05.

Para comparar el porcentaje de larvas/puparios infectados de *A. fraterculus* extraídos de muestras de suelo de las plantas hospedadoras durazno y guayaba, durante el primer periodo de colecta (verano 2007-2008), se utilizó una prueba *t*-Student. Para comparar la proporción de puparios de *A. fraterculus* infectados, provenientes de muestras de suelo de las plantas hospedadoras durazno, nogal y guayaba, durante los dos últimos periodos de colecta (veranos 2008-2009 y 2009-2010) se utilizó un ANOVA de dos factores

(Factor 1 – especie frutal - de tres niveles; Factor 2 – período de colecta - de 2 niveles).

De igual manera, se usó un ANOVA de dos factores para comparar la proporción de puparios de *C. capitata* infectados y obtenidos de muestras de suelo recolectadas de las plantas hospedadoras durazno y nogal, durante los veranos 2008-2009 y 2009-2010. Para comparar la proporción de puparios infectados entre las dos especies de tefrítidos (*A. fraterculus* y *C. capitata*) y entre las muestras de suelo recolectadas debajo de frutos caídos de durazno y nogal durante los veranos 2008-2009 y 2009-2010 se utilizaron pruebas *t*-Student.

Antes de realizar los análisis se procedió a la transformación de los datos para normalizar a los mismos; para ello se utilizó la transformación de rangos (Conover e Iman, 1981).

### **3.9. Pruebas de patogenicidad realizadas con hongos entomopatógenos contra *Anastrepha fraterculus* y *Ceratitis capitata***

#### **3.9.1. Pruebas de patogenicidad realizadas con hongos nativos aislados de *A. fraterculus* (hospederos tefrítidos)**

Debido a que *B. bassiana* es uno de los hongos entomopatógenos mas estudiados a nivel mundial para el control de “moscas de la fruta” (Hernández Días-Ordaz *et al.*, 2010), que las demás cepas aisladas en el presente estudio son reportadas como productoras de toxinas (Peraica *et al.*, 1999) y al hecho de que algunos países fijaron límites reglamentarios para micotoxinas (FAO, 2003), las pruebas de patogenicidad se realizaron con las cuatro cepas de *B. bassiana* aisladas de larvas de *A. fraterculus* colectadas de frutos de guayaba, en el presente trabajo de tesis (Tabla 1). Estas se encuentran depositadas en la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE-CONICET-UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina. Se emplearon larvas L3 de 10 y 7 días de *A. fraterculus* y *C. capitata*, respectivamente provenientes de las crías artificiales.

Se registraron los porcentajes de mortalidad de larvas, pupas y adultos en las dos especies de tefrítidos (*A. fraterculus* y *C. capitata*) ocasionadas por acción de las cuatro cepas de *Beauveria*. El porcentaje de larvas muertas se calculó como el número de larvas del tefrítido infectadas dividido por el número total de larvas huéspedes expuestas a la cepa del hongo x 100. El porcentaje de pupas muertas se calculó como el número de pupas del tefrítido infectadas dividido por el número total de pupas recuperadas x 100. El porcentaje de adultos muertos se calculó como el número de adultos del tefrítido emergidos y luego muertos por infección del hongo dividido por el número total de adultos del tefrítido recuperados x 100. Para determinar el grado de eficacia de las cepas de hongos, lo cual es equivalente al porcentaje de mortalidad real del huésped causado por el enemigo natural, se empleó la fórmula de Abbott (1925) corregida por Rosenhein y Hoy (1987). La fórmula usada fue:

$$Ep = \{1 - [(N'_T * N_o) / (N_T * N'_o)]\} * 100$$

Dónde:

$N'_T$  = número final del fitófago en el tratamiento con el enemigo natural;

$N_T$  = número inicial del fitófago en el tratamiento con el enemigo natural;

$N'_o$  = número final del fitófago en el tratamiento control;

$N_o$  = número inicial del fitófago en el tratamiento control.

Tabla 1. Cepas de hongos entomopatógenos aisladas de larvas de *A. fraterculus*.

| Registro CEPAVE | Especie              | Insecto Hospedero | Localidad            |
|-----------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| CEP321          | <i>Beauveria</i> sp1 | Larva de Af       | Horco Molle, Tucumán |
| CEP322          | <i>Beauveria</i> sp2 | Larva de Af       | Horco Molle, Tucumán |
| CEP323          | <i>Beauveria</i> sp3 | Larva de Af       | Horco Molle, Tucumán |
| CEP324          | <i>Beauveria</i> sp4 | Larva de Af       | Horco Molle, Tucumán |

### 3.9.1.1. Pruebas realizadas mediante el método de inmersión contra larvas de *A. fraterculus*

Para la realización de las pruebas de patogenicidad se preparo una suspensión conocida de conidios para cada cepa de *Beauveria*. Para determinar los porcentajes de viabilidad o germinación de los conidios se procedió como en el apartado 3.6.2.1.

#### 3.9.1.1.1. Obtención del inóculo y Diseño experimental

La suspensión de conidios se obtuvo a partir de cultivos de 15 días, producidos en medio SDYA ¼, incubados a 25°C con un fotoperiodo de 12:12 L:O. Los conidios fueron obtenidos del medio con la ayuda de un ansa bacteriológica y colocados en un tubo de ensayo que contenían 10ml de agua destilada más Tween 80 al 0,01% y esferas de vidrio. Para lograr una suspensión homogénea, los tubos fueron colocados en un agitador vórtex (Arcano®) durante 2 minutos. Posteriormente, se tomó una alícuota de la misma para ser cuantificada utilizando en cámara de Neubauer y se preparó una suspensión con una concentración final de  $1 \times 10^8$  conidios/ml, para realizar las inoculaciones (Figura 20).

Cada cepa de *Beauveria* fue considerada como un tratamiento. Por cada tratamiento se emplearon 150 larvas L3 de *A. fraterculus*. Estas fueron separadas en 3 grupos de 50 y acondicionadas en cápsulas de Petri de 90x20mm. Cada inoculación fue realizada por inmersión en 10ml de suspensión, durante 1 minuto. Para los respectivos controles, se empleó una solución de Tween 80 al 0,01% esterilizado, libre de conidios. Se realizaron 3 repeticiones en el tiempo. Veinticuatro horas después de la inoculación, cuando las larvas pasaron al estado de pupa, estas fueron acondicionadas en cámaras húmedas, para favorecer el crecimiento externo de micelio y mantenidas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 L:O, durante 15 días.



Figura 20. Obtención del inoculo

### 3.9.1.1.2. Seguimiento post-inoculación

Los registros del crecimiento externo de micelio se realizaron cada 24hs durante 15 días posteriores a la inoculación. La confirmación de la mortalidad debido a la especie aplicada fue realizada mediante la visualización del material fúngico en preparados microscópico, bajo microscopio óptico con contraste de fases (Boeco Germany).

### 3.9.1.2. Pruebas realizadas mediante el método de espolvoreo contra larvas de *A. fraterculus* y *C. capitata*

Para la realización de estas pruebas, los conidios secos fueron puestos en contacto directamente sobre las larvas (método de espolvoreo). Para determinar la cantidad de conidios aplicados, se separaron 5 larvas por tratamiento y repetición. Las cuales fueron colocadas en tubos de microcentrifuga tipo Eppendorf con 2ml de Tween 80 al 0,01%, se agitaron durante 1 minuto e inmediatamente se tomo una alícuota para ser cuantificada en cámara de Neubauer. La viabilidad de los conidios se calculo como fue explicado anteriormente.

### 3.9.1.2.1. Diseño experimental

Para la aplicación de los conidios, las larvas L3 de *A. fraterculus* y *C. capitata*, fueron espolvoreadas con pinceles de pelo natural, en toda su superficie.

Cada cepa de *Beauveria* fue considerada como un tratamiento. Se emplearon 150 larvas de cada especie de “mosca de la fruta”, las cuales se colocaron en grupos de 50 en cápsulas de Petri de 90x20mm, donde fueron inoculadas. Inmediatamente después fueron pasadas a otras cápsulas estériles de 90x20mm, para facilitar la pupación. Las larvas para los controles fueron colocadas directamente en las capsulas estériles para su pupación. Se realizaron 3 repeticiones en el tiempo. Veinticuatro horas después las pupas fueron colocadas en cámaras húmedas y se continuó registrando su mortalidad como en los ensayos anteriores (Figura 21).



Figura 21. Pupas en cámara húmeda

### 3.9.2. Análisis estadístico

Las variables respuestas [% mortalidad de larvas, % mortalidad de pupas, % de mortalidad de adultos y eficacia (= % mortalidad real de la plaga)] fueron analizadas individualmente mediante análisis de varianza de dos factores (cepas y fechas de exposición) a un nivel de significancia igual a 0.05.

Luego, la comparación entre medias fue realizada mediante el Test de Tukey a un nivel de significancia de 0.05. Los datos fueron previamente normalizados mediante el procedimiento de transformación de rangos.

Para comparar el grado de patogenicidad entre las cuatro cepas de hongos en función de las distintas fechas de exposición del insecto a estas cepas se utilizaron ANOVAs de dos factores (Factor 1 –cepas de hongos– de 4 niveles; Factor 2 –fechas de exposición del insecto a las cepas– de 3 niveles). Estos análisis se usaron tanto para evaluar la mortalidad en *A. fraterculus* como en *C. capitata*. Para comparar la patogenicidad de las cuatro cepas de hongos en función de los dos métodos de infección usados (espolvoreo vs inmersión), se utilizaron ANOVAs de dos factores (Factor 1 –cepas de hongos– de 4 niveles; Factor 2 –método de infección– de 2 niveles). De manera similar, se usó un ANOVA de dos factores para comparar estadísticamente la eficacia de las cepas de hongos ante *C. capitata* y *A. fraterculus* (Factor 1 –cepas de hongos– de 4 niveles; Factor 2 –especies de tefritido– de 2 niveles). Este último análisis solo pudo realizarse para el método de infección por espolvoreo.

### **3.9.3. Pruebas de patogenicidad realizadas con hongos aislados de hospederos no-tefritidos**

Las pruebas de patogenicidad se realizaron con tres cepas de *B. bassiana* y una de *Isaria fumosorosea* (Ascomycota: Hypocreales), provenientes de la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE-CONICET-UNLP (Tabla 2). Para la selección de los aislamientos se tuvo en cuenta el porcentaje de viabilidad de los conidios, habiendo sido seleccionados aquellos que tuvieron un porcentaje de viabilidad superior a 95%, que fue determinado como se explica en el apartado **2.6.2.1**. Para la realización de las pruebas se emplearon larvas L3 y hembras de *A. fraterculus* de un rango de edad de 2 a 5 días (Figura 22).

Se registraron los porcentajes de mortalidad ocasionadas por la acción de las cuatro cepas de hongos.



Figura 22. Larvas *A. fraterculus*

Tabla 2. Cepas de hongos entomopatógenos aisladas de hospederos no-tefrítidos.

| Registro | Especie               | Insecto Hospedero  |
|----------|-----------------------|--|
| CEP 148  | <i>B. bassiana</i>    | <i>Cycloneda sanguinea</i><br>(Coleoptera: Coccinellidae)    |
| CEP 189  | <i>B. bassiana</i>    | <i>Oliarus dimidiatus</i><br>(Hemiptera: Cixiidae)           |
| CEP 229  | <i>B. bassiana</i>    | <i>Paysandisia arcton</i><br>(Lepidoptera: Castniidae)       |
| CEP 316  | <i>I. fumosorosea</i> | <i>Trialeurodes vaporariorum</i><br>(Hemiptera: Aleyrodidae) |

### 3.9.3.1. Obtención del inóculo y diseño experimental

Para la producción del inóculo se procedió de igual manera que en las pruebas realizadas contra larvas de *A. fraterculus* (apartado 3.9.1.1.1.). En este caso se empleó una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml.

Igualmente que en los casos anteriores, cada cepa fue considerada como un tratamiento. Las cepas CEP 148 y CEP 189 fueron empleadas para

realizar la inoculación por el método de inmersión, y las cepas CEP189 y CEP 316 por el método de aspersión, de los adultos de la plaga. Las larvas fueron inoculadas con las cepas CEP 148, CEP 189 y CEP 229. Se emplearon 50 adultos hembras y 50 larvas de *A. fraterculus* por tratamiento. Para los respectivos controles, se empleo una solución de Tween 80 al 0,01% esterilizado, libre de conidios. Se realizo una réplica, por lo cual no se aplicó ningún análisis estadístico.

#### **3.9.3.1.1. Pruebas realizadas contra adultos de *A. fraterculus***

Para evaluar la patogenicidad de las cepas seleccionadas, contra hembras de *A. fraterculus* se emplearon dos métodos de aplicación.

A) Inmersión. Cada grupo de 30 hembras fueron colocadas en una capsula de Petri de plástico de 90x20mm, donde el fondo de la misma, fue reemplazado por una tela mosquitera de plástico, para permitir el paso de la suspensión. Diez mililitros de suspensión de conidios fueron colocados en un recipiente de plástico de 110mm de diámetro, donde las capsula con las moscas fueron sumergidas, hasta que todas fueran totalmente humedecidas.

B) Aspersión. Para realizar la inoculación sobre las moscas, estas fueron colocadas en jaulas de acrílico de 20x20x20cm, dentro de la cual se realizó la aspersión de 3 ml de la suspensión fúngica con atomizadores de plástico tipo perfumero.

Inmediatamente después de la inoculación, los adultos fueron colocados sobre un papel de filtro estéril para absorber el resto de humedad. Posteriormente, fueron colocadas en jaulas de plástico de 12x15x23cm, con agua y alimento *ad libitum*, durante 10 días. Cada 24hs se retiraron los individuos muertos.

### 3.9.3.1.2. Pruebas realizadas contra larvas de *A. fraterculus*

La evaluación de la patogenicidad sobre larvas de *A. fraterculus*, se realizó mediante la aspersión de 3 ml de suspensión sobre la superficie de tierra estéril. Para ello se prepararon potes de plástico, de 5 cm de alto y 7 cm de diámetro con 2 cm. de tierra estéril (medio de pupación), con tapa perforada. Inmediatamente después de la aspersión, fueron colocada las larvas, sobre la superficie de la tierra, para facilitar el contacto con los conidios al momento de enterrado de las mismas. Las pupas permanecieron en los potes, aproximadamente 14 días, hasta el momento de eclosión de los adultos. Las pupas no eclosionadas fueron retiradas.

### 3.9.3.2. Seguimiento post-inoculación

Tanto los adultos muertos como las pupas no eclosionadas, fueron colocadas en cámaras húmedas y acondicionadas a 25°C, con un fotoperiodo de 12:12, L:O. hasta el crecimiento de micelio externo. La muerte ocasionada por la cepa inoculada se confirmó mediante la observación del material fúngico en preparados microscópicos, bajo microscopio óptico con contraste de fases (Boeco Germany).

## 3.10. Evaluación del sinergismo entre un parasitoide nativo del neotrópico y un hongo entomopatógeno aislado de un hospedero no-tefrítido sobre larvas de *C. capitata* en condiciones experimentales de campo

Para evaluar el sinergismo existente entre el hongo entomopatógeno y el parasitoide, se registraron los porcentajes de mortalidad de las larvas, pupas y adultos en *C. capitata*, ocasionadas por acción de la cepa de *B. bassiana*, como así también la eficacia de esta cepa de hongo contra la especie de tefrítido plaga. Estas mortalidades y la eficacia se calcularon de la misma manera como fue detallado previamente en el apartado **3.8.1**. Además, se

calculó el porcentaje de mortalidad total del tefrítido por infección con el hongo entomopatógeno como la sumatoria del número de larvas, pupas y adultos de *C. capitata* infectados por el hongo dividido por el número total de larvas huéspedes expuestas x 100. El porcentaje de parasitismo efectivo en *C. capitata* por acción de *C. haywardi* fue calculado como el número total de parasitoides emergidos dividido por el número total de larvas huéspedes expuestas x 100. También se calculó el porcentaje de parasitoides infectados con el hongo. Esta variable fue calculada como la sumatoria de pupas y adultos del parasitoide con signos de infección dividido por el número total de parasitoides (infectados + no infectados) x 100.

### 3.10.1. Hongo entomopatógeno

Para el presente estudio se utilizó el aislamiento CEP 537 de *B. bassiana* aislado de *Myzus* sp (Hemiptera: Aphididae). Esta cepa fue provista por la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE. Se utilizó este aislamiento porque en las pruebas preliminares de patogenicidad fue la que mayor porcentaje de mortalidad produjo.

Se utilizaron los conidios del primer repique re-aislados a partir de adultos de *A. fraterculus*, en medio de cultivo SDYA ¼.

### 3.10.2. Parasitoide

Se emplearon hembras fecundadas y sin experiencia previa de oviposición del parasitoide de pupas, *C. haywardi*, que fueron provistas por el Laboratorio de Investigaciones Ecoetológicas de Moscas de la Fruta y sus Enemigos Naturales (LIEMEN). Las hembras tenían un rango de edad de 8 a 15 días y estaban alimentadas con miel y agua *ad libitum*.

### 3.10.3. Insecto plaga huésped

Las larvas L3 de *C. capitata*, empleadas en este ensayo, fueron provistas por el Laboratorio de Investigaciones Ecoetológicas de Moscas de la Fruta y sus Enemigos Naturales (LIEMEN).

### 3.10.4. Planta hospedera

Se emplearon plantines de *Citrus sinensis* Osbeck (naranja dulce), *C. paradisi* Macfad (pomelo) y *C. limon* (L.) Burm (limón) de una altura promedio de 1.5 mts provistos por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Famaillá, Tucumán.

### 3.10.5. Obtención del inóculo y diseño experimental

La suspensión de conidios se obtuvo a partir de cultivos de 15 días, producidos en medio SDYA ¼, incubados a 25°C con un fotoperiodo de 12:12 L:O. Los conidios fueron obtenidos del medio con la ayuda de un ansa bacteriológica y colocados en un tubo de ensayo que contenían 10ml agua destilada con Tween 80 al 0,01% y esferas de vidrio. Para lograr una suspensión homogénea, los tubos fueron colocados en un agitador vórtex (Arcano®) durante 2 minutos. Posteriormente, se tomó una alícuota de la misma para ser cuantificada utilizando una cámara de Neubauer y se preparó una suspensión con una concentración final de  $1 \times 10^8$  conidios/ml, para realizar las inoculaciones.

Los ensayos se realizaron en condiciones experimentales de campo, para ellos se colocó debajo de la sombra de árboles una jaula cilíndrica de tela antiáfidos de 3mts de alto y 2.5 mts. de diámetro, dentro de la cual se colocó una jaula cilíndrica de tela de voile de 3mts de alto y 2 mts. de diámetro. Para simular un ambiente natural se colocaron en el interior de la jaula 15 plantines. En la base de los plantines se colocaron jaulas de plástico y tela voile de 12

cm. de alto, 23 cm. de ancho y 28 cm. de profundidad, con 500cm<sup>3</sup> de tierra esterilizada en autoclave, de la región de la selva de las Yunga, Horco Molle, Tucumán (Figura 23). Los rangos promedios de temperatura y humedad relativa registrados fueron 15±1-25±1°C y 50±1-89±1% HR, respectivamente.

Se realizaron tres tratamientos más un control; en el control se contabilizó la mortalidad natural de la plaga, en dos tratamientos se evaluó la acción individual del hongo y del parasitoide, mientras que el tercer tratamiento se analizó la acción conjunta de ambos enemigos naturales sobre la plaga.

Para evaluar la acción conjunta de ambos enemigos naturales, aproximadamente 3 ml. de suspensión de conidios fueron aplicados por aspersión, mediante un atomizador de plástico, sobre la superficie de la tierra (Figura 24). Posteriormente, se colocaron 100 larvas de *C. capitata* del tercer estadio (7d) para facilitar el contacto con los conidios, en el momento de enterrado de las mismas. Luego de 24 horas, cuando las larvas pasaron al estado de pupa, fueron liberadas en el interior de las jaulas de plástico 50 hembras de *C. haywardi*, durante 24. Pasada las 48 hs. del comienzo del ensayo se retiraron de las jaulas de campo los parasitoides, pupas y larvas.

De igual manera se procedió para la realización de los tratamientos para evaluar la acción individual del hongo entomopatógeno y el parasitoide, respetando los tiempos de aplicación de cada uno. Para el control se aplicó Tween 80 al 0.01% estéril libre de conidios, sobre la superficie de la tierra. En los tres casos también se retiraron de las jaulas de campo los parasitoides, pupas y larvas, a las 48hs de iniciado el ensayo.

Las larvas y pupas muertas en jaulas de campo fueron retiradas, y las vivas se colocaron en potes de plástico, de 5 cm de alto y 7cm de diámetro con 2 cm. de tierra estéril humedecida y cubierto con una tapa perforada, hasta la emergencia de los adultos (Figura 25).

Las hembras del parasitoide se colocaron en jaulas de plástico de 12x15x23cm, con agua y miel *ad libitum*, durante 10 días. Cada 24hs se retiraron los individuos muertos.

Luego de la emergencia de los adultos, se retiraron las pupas no eclosionadas. Los adultos emergidos, tanto de la “mosca de la fruta” como del parasitoide, se colocaron en jaulas de plástico de de 12x15x23cm, de alto con agua y alimento, durante 10 días. Cada 24hs se retiraron los individuos muertos.

Todos los individuos muertos y las pupas no eclosionadas fueron esterilizados superficialmente en hipoclorito de sodio al 0,5% durante 1 minuto y pasados por dos baños sucesivos en agua destilada estéril y colocados en cámaras húmedas para permitir el crecimiento externo del micelio (Lacey y Brooks 1997). La confirmación de la mortalidad debida al hongo se realizó mediante la visualización del material fúngico en preparados microscópicos, bajo microscopio óptico con contraste de fases (Boeco Germany).

Las pupas, adultos de moscas, parasitoides y cámaras húmedas, fueron mantenidos en una cámara de cría acondicionada a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\pm 5\%$  de HR y un fotoperiodo de 12:12 L:O.



Figura 23. Jaula de campo



Figura 24. Inoculación del hongo entomopatógeno



Figura 25. Potes de plástico con tierra estéril

### 3.10.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se consideraron las siguientes variables respuestas: eficacia (= % mortalidad real de la plaga), % de mortalidad total del tefritido por infección con el hongo y % de parasitismo. Las mismas fueron analizadas individualmente mediante análisis de varianza de dos factores y pruebas *t*-students, a un nivel de significancia igual a 0.05. En el caso del ANOVA, la comparación entre medias fue realizada mediante el Test de Tukey a un nivel de significancia de 0.05. Los datos fueron previamente normalizados mediante el procedimiento de transformación de rangos (Conover e Iman, 1981). Para comparar la eficacia del hongo, del parasitoide y de ambos agentes de control en función de las distintas fechas de exposición de *C.*

*capitata* a estos enemigos naturales, se utilizó un ANOVA de dos factores (Factor 1 –Tratamientos– de 3 niveles; Factor 2 –fechas de exposición del tefrítido– de 3 niveles). Para comparar el porcentaje de mortalidad total del tefrítido solo por infección con el hongo registrado entre los dos tratamientos que involucraron la presencia de este agente, se utilizó una prueba *t*-Student. De manera similar, se usó una prueba *t*-Student para comparar el porcentaje de parasitismo entre los dos tratamientos que involucraron la presencia del parasitoide *C. haywardi*.

Los análisis se realizaron con el programa StatSoft, Inc. versión 7 (2004).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificación de los hongos entomopatógenos y caracterización morfológica y fisiológica de las cepas de *Beauveria bassiana* aisladas larvas de *A. fraterculus*

En la Tabla 3 se presentan el número de acceso a la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE-CONICET de los 59 aislamientos de hongos asociados a “moscas de la fruta”, obtenidas en la localidad de Horco Molle, así como la especie del insecto hospedador y estado de vida desde el cual se aisló, la planta hospedera del insecto y la fecha de muestreo.

Tabla 3. Aislamientos obtenidos a partir de *A. fraterculus* y *C. capitata*, de la región de Horco Molle, Yerba Buena, Tucumán.

| Especie fúngica           | Nro. Colección | Insecto hospedador    | Estado de vida hospedador | Planta hospedera del insecto | Sustrato insecto hospedador | Fecha de muestreo |
|---------------------------|----------------|-----------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| <i>Beauveria bassiana</i> | 321            | <i>A. fraterculus</i> | larva                     | guayaba                      | fruta                       | 27/03/2008        |
| <i>Beauveria bassiana</i> | 322            | <i>A. fraterculus</i> | larva                     | guayaba                      | fruta                       | 27/03/2008        |
| <i>Beauveria bassiana</i> | 323            | <i>A. fraterculus</i> | larva                     | guayaba                      | fruta                       | 27/03/2008        |
| <i>Beauveria bassiana</i> | 324            | <i>A. fraterculus</i> | larva                     | guayaba                      | fruta                       | 27/03/2008        |
| <i>Fusarium</i> sp3       | 482            | <i>A. fraterculus</i> | pupa                      | durazno                      | fruta                       | 29/12/2008        |
| <i>Fusarium</i> sp1       | 483            | <i>C. capitata</i>    | pupa                      | durazno                      | suelo                       | 13/01/2009        |
| <i>Fusarium</i> sp3       | 484            | <i>A. fraterculus</i> | pupa                      | nogal                        | suelo                       | 22/01/2009        |
| <i>Fusarium</i> sp1       | 485            | <i>A. fraterculus</i> | pupa                      | nogal                        | suelo                       | 22/01/2009        |
| <i>Fusarium</i> sp2       | 486            | <i>A. fraterculus</i> | larva                     | nogal                        | fruta                       | 22/01/2009        |
| <i>Fusarium</i> sp2       | 487            | <i>A. fraterculus</i> | larva                     | nogal                        | fruta                       | 22/01/2009        |
| <i>Fusarium</i> sp3       | 488            | <i>A. fraterculus</i> | pupa                      | guayaba                      | fruta                       | 27/03/2009        |
| <i>Mucor</i> sp           | 489            | <i>A. fraterculus</i> | pupa                      | guayaba                      | fruta                       | 27/03/2009        |

|                                  |     |                       |        |         |       |            |
|----------------------------------|-----|-----------------------|--------|---------|-------|------------|
| <i>Fusarium</i> sp3              | 490 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 27/03/2009 |
| <i>Aspergillus affinis niger</i> | 491 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 27/03/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp3              | 492 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 27/03/2009 |
| <i>Mucor</i> sp                  | 493 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 27/03/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp1              | 494 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | suelo | 03/04/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp1              | 495 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 03/04/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp2              | 496 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 03/04/2009 |
| <i>Aspergillus</i> sp            | 497 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 03/04/2009 |
| <i>Penicillium</i> sp2           | 498 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 03/04/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp2              | 499 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 08/04/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp2              | 500 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | suelo | 08/04/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp2              | 501 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | suelo | 08/04/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp3              | 502 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 08/04/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp3              | 503 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 08/04/2009 |
| <i>Mucor</i> sp                  | 504 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | fruta | 08/04/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp3              | 505 | <i>A. fraterculus</i> | adulto | guayaba | fruta | 08/04/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp3              | 506 | <i>A. fraterculus</i> | adulto | guayaba | fruta | 08/04/2009 |
| <i>Fusarium</i> sp2              | 507 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | guayaba | suelo | 14/04/2009 |
| <i>Aspergillus</i> sp            | 508 | <i>C. capitata</i>    | adulto | durazno | fruta | 28/12/2009 |
| <i>Aspergillus niger</i>         | 509 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | nogal   | fruta | 05/01/2010 |
| <i>Aspergillus affinis niger</i> | 510 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | nogal   | fruta | 05/01/2010 |
| <i>Aspergillus affinis niger</i> | 511 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | nogal   | fruta | 13/01/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp3              | 512 | <i>Anastrepha</i> sp. | pupa   | nogal   | fruta | 20/01/2010 |
| <i>Mucor</i> sp                  | 513 | <i>Anastrepha</i> sp. | pupa   | nogal   | fruta | 20/01/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp3              | 514 | <i>A. fraterculus</i> | pupa   | durazno | fruta | 26/01/2010 |

---

|                          |     |                       |       |         |       |            |
|--------------------------|-----|-----------------------|-------|---------|-------|------------|
| <i>Mucor</i> sp          | 515 | <i>A. fraterculus</i> | larva | nogal   | fruta | 26/01/2010 |
| <i>Mucor</i> sp          | 516 | <i>A. fraterculus</i> | larva | nogal   | fruta | 26/01/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp1      | 517 | <i>C. capitata</i>    | pupa  | nogal   | fruta | 26/01/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp1      | 518 | <i>C. capitata</i>    | pupa  | nogal   | fruta | 26/01/2010 |
| <i>Penicillium</i> sp1   | 519 | <i>Anastrepha</i> sp. | larva | nogal   | fruta | 26/01/2010 |
| <i>Penicillium</i> sp1   | 520 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | nogal   | fruta | 26/01/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp1      | 521 | <i>C. capitata</i>    | pupa  | nogal   | fruta | 26/01/2010 |
| <i>Penicillium</i> sp1   | 522 | <i>C. capitata</i>    | pupa  | nogal   | fruta | 03/02/2010 |
| <i>Aspergillus</i> sp    | 523 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 15/04/2010 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 524 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 15/04/2010 |
| <i>Penicillium</i> sp1   | 525 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 15/04/2010 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 526 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 15/04/2010 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 527 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 15/04/2010 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 528 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 27/04/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp3      | 529 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 27/04/2010 |
| <i>Penicillium</i> sp2   | 530 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 05/05/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp3      | 531 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 05/05/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp1      | 532 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 05/05/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp3      | 533 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 05/05/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp3      | 534 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 05/05/2010 |
| <i>Fusarium</i> sp3      | 535 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 05/05/2010 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 536 | <i>A. fraterculus</i> | pupa  | guayaba | fruta | 05/05/2010 |

---

Como resultado de la selección de cepas patógenas contra las “moscas de la fruta”, se obtuvieron cincuenta y nueve aislamientos, de los cuales, cuatro corresponden al hongo entomopatógeno *B. bassiana*.

A continuación se presenta una descripción más detallada de esta especie de hongo entomopatógeno.

**Beauveria bassiana** (Bals.) Vuill.

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Cordycipitaceae

El análisis del diámetro de las colonias, de las cuatro cepas de *B. bassiana*, mostraron diferencias significativas entre ellas ( $F_{(3,36)}=7,76$ ;  $P=0,0004$ ). Los mayores diámetros registrados fueron para CEP 322 y CEP 323, y los menores para CEP 321 y CEP 324, observándose diferencias significativas entre estos dos grupos (Test de Tukey,  $P=0,05$ ) (Tabla 4).

Se observaron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de las cuatro cepas de *B. bassiana* ( $F_{(3,36)}=4,58$ ;  $P=0,0081$ ). Los mayores valores fueron registrados para CEP 322 y CEP 323, y los menores para CEP 321 y CEP 324, observándose diferencias significativas entre ambos grupos (Test de Tukey,  $P=0,05$ ) (Tabla 4).

Todos los aislamientos de *B. bassiana* presentaron micelio blanco de aspecto pulverulento (Figura 26). El reverso de la colonia mostró una pigmentación de color amarillo pálido. En los aislamientos CEP 321 y CEP 324 se observó la presencia de gotas de exudado transparente.

Tabla 4. Descripción macroscópica de *B. bassiana*

| N° Colección<br>CEPAVE | Color colonia | Diámetro colonia<br>(mm)* | Tasa de<br>crecimiento<br>(mm/día)+ |
|------------------------|---------------|---------------------------|-------------------------------------|
| CEP 321                | Blanco        | 11,60 (0,56) <b>A</b>     | 0,63 (0,07) <b>A</b>                |
| CEP 322                | Blanco        | 17,35 (1,55) <b>B</b>     | 1,16 (0,16) <b>B</b>                |
| CEP 323                | Blanco        | 17,75 (0,99) <b>B</b>     | 1,1 (0,12) <b>B</b>                 |
| CEP 324                | Blanco        | 15,20 (0,63) <b>A</b>     | 1 (0,19) <b>A</b>                   |

\* Diámetro promedio de la colonia ( $\pm$  Error estándar de la media) determinado a los 10 días post-incubación a 25 °C y 12:12 L:O. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

+ Tasa de crecimiento promedio ( $\pm$  Error estándar de la media) determinado como el diámetro de colonia/el tiempo de incubación. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

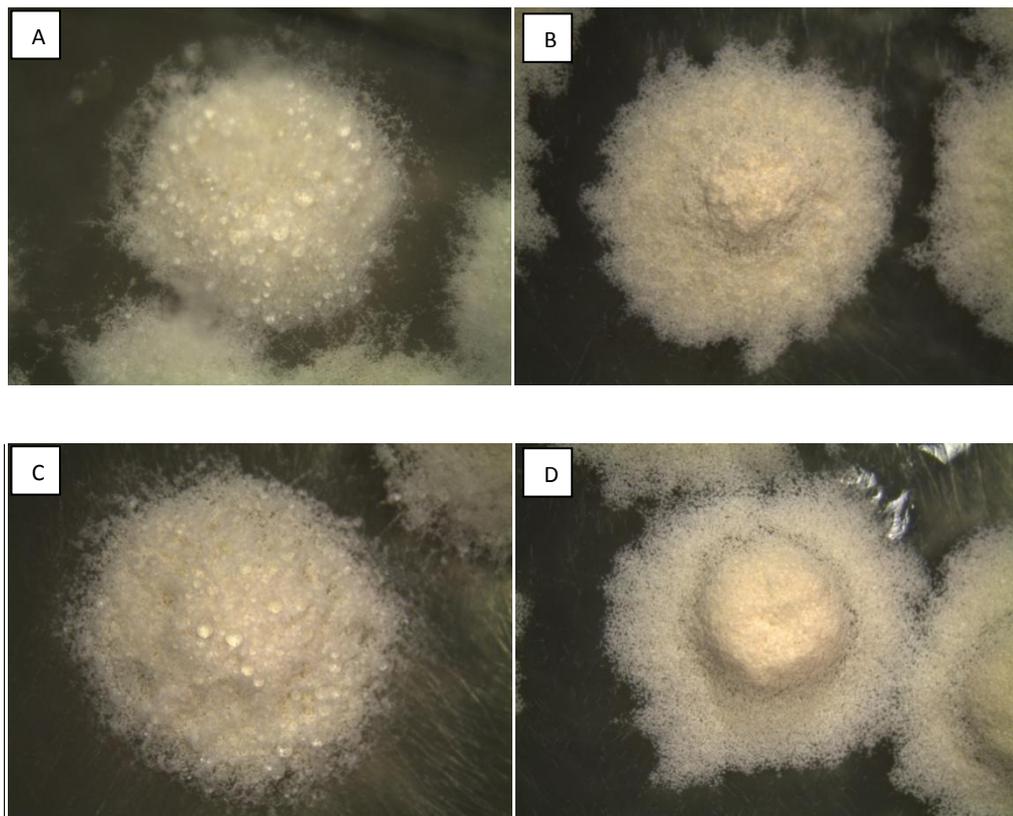


Figura 26. Colonias de *B. bassiana*. A) CEP 321; B) CEP 322; C) CEP 323; D) CEP 324

Las diferencias en el diámetro mayor (DMa) de los conidios entre los diferentes aislamientos fúngicos fueron significativas ( $F_{(3,76)}=5,67$ ;  $P < 0,0015$ ), observando el valor máximo en CEP 321 ( $10,91 \pm 0,23\mu\text{m}$ ) y el valor mínimo en CEP 324 ( $9,77 \pm 0,20\mu\text{m}$ ); el DMa promedio de los conidios fue de  $10,27 \pm 0,11\mu\text{m}$ . Las diferencias en el diámetro menor (DMe) de los conidios entre los diferentes aislamientos fúngicos fueron significativas ( $F_{(3,76)}=3,37$ ;  $P < 0,0229$ ), observando el valor máximo en CEP 321 ( $9,94 \pm 0,24\mu\text{m}$ ) y el valor mínimo en CEP 324 ( $9,08 \pm 0,20\mu\text{m}$ ); el DMe promedio de los conidios fue de  $9,45 \pm 0,10\mu\text{m}$  (Tabla 5).

Veinticuatro horas después de la siembra, las cepas presentaron un porcentaje de germinación de  $86 \pm 4,42\%$ ,  $96,43 \pm 1,33\%$ ,  $87,18 \pm 2,86\%$  y  $95,83 \pm 0,86\%$  para las cepas CEP 321, CEP 322, CEP 323 y CEP 324, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre las cuatro cepas ( $F_{(3,20)}= 4,06$ ;  $P=0,20$ ).

Las cuatro cepas de *B. bassiana* presentaron una alta producción de conidios, con valores mayores a  $10^8$  conidios/ml. La cepa CEP 322 presentó el valor más alto, produciendo  $2,1 \times 10^8 \pm 2,2 \times 10^7$  conidios/ml en comparación con CEP 321, CEP 323 y CEP 324, las cuales produjeron  $2 \times 10^8 \pm 2,5 \times 10^7$ ,  $1,7 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^7$  y  $1,6 \times 10^8 \pm 2,4 \times 10^7$  conidios/ml, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la producción de conidios entre las cuatro cepas ( $F_{(3,96)}= 1,41$ ;  $P=0,2457$ ).

Tabla 5. Descripción microscópica de *B. bassiana*

| N° Colección<br>CEPAVE | Forma                | CONIDIOS              |                       |
|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                        |                      | Diámetro (µm)*        |                       |
|                        |                      | Mayor                 | Menor                 |
| CEP 321                | globosos-subglobosos | 10,91 (0,23) <b>B</b> | 9,94 (0,24) <b>B</b>  |
| CEP322                 | globosos-subglobosos | 10,23 (0,21) <b>B</b> | 9,35 (0,21) <b>AB</b> |
| CEP 323                | globosos-subglobosos | 10,16 (0,15) <b>A</b> | 9,42 (0,12) <b>AB</b> |
| CEP 324                | globosos-subglobosos | 9,77 (0,20) <b>A</b>  | 9,08 (0,20) <b>A</b>  |

\*Mediciones del largo y ancho de los conidios ( $\pm$  Error estándar de la media). Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Incidencia y variación estacional de las infecciones fúngicas en *Anastrepha fraterculus* y *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en Guayaba, Durazno y Nogal

Los valores totales de las muestras recolectadas debajo de los árboles de durazno, nogal y guayaba en el área de estudio, durante los tres periodos de muestreo (veranos 2007-2008, 2008-2009 y 2009-2010), se presentan en las Tablas 6 y 7 para puparios y larvas de *A. fraterculus* y *C. capitata* obtenidas de muestras de suelo, respectivamente y en las Tablas 8 y 9 para puparios y larvas de *A. fraterculus* y *C. capitata* obtenidas de muestras de frutas, respectivamente.

En total se obtuvieron 8.423 puparios más 9 larvas de *A. fraterculus* y 771 puparios de *C. capitata* de un total de 364.539 cm<sup>3</sup> de tierra colectada. El 6% del total de los puparios de *A. fraterculus* y el 2,7% de los puparios de *C. capitata* provenientes del suelo estuvieron infectados (Tabla 6 y 7).

De los 74.345 gr (2.242 frutas) de fruta recolectada se obtuvieron en total 953 larvas de *A. fraterculus* y 14 larvas de *C. capitata*. Solo el 1,8% de las larvas de *A. fraterculus* encontradas en las frutas estuvieron infestadas (Tabla 8 y 9).

Tabla 6. Número total de puparios y larvas de *A. fraterculus* obtenidas de muestras de suelo colectadas debajo de árboles de durazno, nogal y guayaba en Horco Molle, Tucumán, entre diciembre de 2007 y mayo de 2010.

| Especie<br>frutal,<br>Período y Fecha<br>de<br>colecta | Muestras de   |              |           | <i>Anastrepha fraterculus</i>        |                                    |                        |      |                      |   |
|--|---------------|--------------|-----------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------|------|----------------------|---|
|  | Suelo (total) |              |           | Nº total de<br>puparios<br>obtenidos | Nº total de<br>larvas<br>obtenidas | Puparios<br>infectados |      | Larvas<br>infectadas |   |
|  | Nº            | Vol<br>(cm3) | Peso (gr) |                                      |                                    | Nº                     | %    | Nº                   | % |
| <b>Durazno</b>   |               |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| <i>Verano 07-08</i>                                    |               |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| 28/12/2007   | 10            | 13.040       | 7017      | 131                                  | 0                                  | 10                     | 7,6  | 0                    | 0 |
| 03/01/2008   | 10            | 13.059       | 7021      | 111                                  | 3                                  | 4                      | 3,6  | 0                    | 0 |
| <i>Verano 08-09</i>                                    |               |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| 23/12/2008   | 10            | 13.101       | 7109      | 176                                  | 5                                  | 41                     | 23,3 | 0                    | 0 |
| 29/12/2008   | 10            | 13.009       | 7001      | 70                                   | 0                                  | 11                     | 15,7 | 0                    | 0 |
| 13/01/2009   | 10            | 13.008       | 7002      | 15                                   | 0                                  | 0                      | 0    | 0                    | 0 |
| 22/01/2009   | 10            | 13.012       | 7005      | 12                                   | 0                                  | 0                      | 0    | 0                    | 0 |
| <i>Verano 09-10</i>                                    |               |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| 28/12/2009   | 10            | 13.001       | 7003      | 144                                  | 1                                  | 8                      | 5,6  | 0                    | 0 |
| 05/01/2010   | 10            | 13.019       | 7011      | 19                                   | 0                                  | 1                      | 5,3  | 0                    | 0 |
| 13/01/2010   | 10            | 13.007       | 7001      | 12                                   | 0                                  | 0                      | 0    | 0                    | 0 |
| 20/01/2010   | 10            | 13.023       | 7013      | 15                                   | 0                                  | 0                      | 0    | 0                    | 0 |
| <b>Nogal</b>   |               |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| <i>Verano 08-09</i>                                    |               |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| 29/12/2008   | 10            | 13.009       | 7010      | 12                                   | 0                                  | 0                      | 23,3 | 0                    | 0 |
| 13/01/2009   | 10            | 13.013       | 7011      | 21                                   | 0                                  | 0                      | 15,7 | 0                    | 0 |
| 22/01/2009   | 10            | 13.031       | 7042      | 19                                   | 0                                  | 3                      | 15,8 | 0                    | 0 |
| 29/01/2009   | 10            | 13.010       | 7008      | 14                                   | 0                                  | 0                      | 0    | 0                    | 0 |
| <i>Verano 09-10</i>                                    |               |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| 05/01/2010   | 10            | 13.023       | 7012      | 125                                  | 0                                  | 13                     | 10,4 | 0                    | 0 |
| 13/01/2010   | 10            | 13.005       | 7006      | 143                                  | 0                                  | 8                      | 5,6  | 0                    | 0 |
| 20/01/2010   | 10            | 13.028       | 7015      | 8                                    | 0                                  | 8                      | 4,7  | 0                    | 0 |
| 26/01/2010   | 10            | 13.002       | 7008      | 32                                   | 0                                  | 32                     | 15,8 | 0                    | 0 |
| <b>Guayaba</b>   |               |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| <i>Verano 07-08</i>                                    |               |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| 27/03/2008   | 10            | 13.003       | 7009      | 1.301                                | 0                                  | 31                     | 2,4  | 0                    | 0 |

|                     |    |        |      |       |   |    |      |   |   |
|---------------------|----|--------|------|-------|---|----|------|---|---|
| 03/04/2008          | 10 | 13.018 | 7010 | 1.069 | 0 | 32 | 3    | 0 | 0 |
| <i>Verano 08-09</i> |    |        |      |       |   |    |      |   |   |
| 27/03/2009          | 10 | 13.017 | 7008 | 1.061 | 0 | 85 | 8    | 0 | 0 |
| 03/04/2009          | 10 | 13.008 | 7002 | 842   | 0 | 14 | 1,7  | 0 | 0 |
| 08/04/2009          | 10 | 13.034 | 7032 | 1.112 | 0 | 51 | 4,6  | 0 | 0 |
| 14/04/2009          | 10 | 13.006 | 7003 | 999   | 0 | 28 | 2,8  | 0 | 0 |
| <i>Verano 09-10</i> |    |        |      |       |   |    |      |   |   |
| 07/04/2010          | 10 | 13.021 | 7011 | 350   | 0 | 56 | 16   | 0 | 0 |
| 15/04/2010          | 10 | 13.011 | 7004 | 335   | 0 | 32 | 9,6  | 0 | 0 |
| 27/04/2010          | 10 | 13.019 | 7014 | 176   | 0 | 25 | 14,2 | 0 | 0 |
| 05/05/2010          | 10 | 13.002 | 7006 | 99    | 0 | 9  | 9,1  | 0 | 0 |

Tabla 7. Número total de puparios y larvas de *C. capitata* obtenidas de muestras de suelo colectadas debajo de árboles de durazno, nogal y guayaba en Horco Molle, Tucumán, entre diciembre de 2007 y mayo de 2010.

| Especie<br>frutal,<br>Período y Fecha<br>de<br>colecta | <i>Ceratitis capitata</i>    |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
|--|------------------------------|--------------|-----------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------|------|----------------------|---|
|  | Muestras de<br>Suelo (total) |              |           | Nº total de<br>puparios<br>obtenidos | Nº total de<br>larvas<br>obtenidas | Puparios<br>infectados |      | Larvas<br>infectadas |   |
|  | Nº                           | Vol<br>(cm3) | Peso (gr) |                                      |                                    | Nº                     | %    | Nº                   | % |
| <b>Durazno</b>   |                              |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| <i>Verano 07-08</i>                                    |                              |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| 28/12/2007   | 10                           | 13.040       | 7017      | 49                                   | 0                                  | 2                      | 4,1  | 0                    | 0 |
| 03/01/2008   | 10                           | 13.059       | 7021      | 47                                   | 0                                  | 4                      | 8,5  | 0                    | 0 |
| <i>Verano 08-09</i>                                    |                              |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| 23/12/2008   | 10                           | 13.101       | 7109      | 30                                   | 0                                  | 2                      | 6,7  | 0                    | 0 |
| 29/12/2008   | 10                           | 13.009       | 7001      | 3                                    | 0                                  | 0                      | 0    | 0                    | 0 |
| 13/01/2009   | 10                           | 13.008       | 7002      | 1                                    | 0                                  | 0                      | 0    | 0                    | 0 |
| 22/01/2009   | 10                           | 13.012       | 7005      | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0    | 0                    | 0 |
| <i>Verano 09-10</i>                                    |                              |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| 28/12/2009   | 10                           | 13.001       | 7003      | 60                                   | 0                                  | 3                      | 5    | 0                    | 0 |
| 05/01/2010   | 10                           | 13.019       | 7011      | 3                                    | 0                                  | 0                      | 0    | 0                    | 0 |
| 13/01/2010   | 10                           | 13.007       | 7001      | 59                                   | 0                                  | 0                      | 0    | 0                    | 0 |
| 20/01/2010   | 10                           | 13.023       | 7013      | 19                                   | 0                                  | 3                      | 15,8 | 0                    | 0 |
| <b>Nogal</b>   |                              |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |
| <i>Verano 08-09</i>                                    |                              |              |           |                                      |                                    |                        |      |                      |   |

|                     |    |        |      |     |   |   |     |   |   |
|---------------------|----|--------|------|-----|---|---|-----|---|---|
| 29/12/2008          | 10 | 13.009 | 7010 | 1   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| 13/01/2009          | 10 | 13.013 | 7011 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| 22/01/2009          | 10 | 13.031 | 7042 | 1   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| 29/01/2009          | 10 | 13.010 | 7008 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| <i>Verano 09-10</i> |    |        |      |     |   |   |     |   |   |
| 05/01/2010          | 10 | 13.023 | 7012 | 25  | 0 | 1 | 4   | 0 | 0 |
| 13/01/2010          | 10 | 13.005 | 7006 | 64  | 0 | 2 | 3,1 | 0 | 0 |
| 20/01/2010          | 10 | 13.028 | 7015 | 155 | 0 | 4 | 2,6 | 0 | 0 |
| 26/01/2010          | 10 | 13.002 | 7008 | 254 | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| <b>Guayaba</b>      |    |        |      |     |   |   |     |   |   |
| <i>Verano 07-08</i> |    |        |      |     |   |   |     |   |   |
| 27/03/2008          | 10 | 13.003 | 7009 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| 03/04/2008          | 10 | 13.018 | 7010 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| <i>Verano 08-09</i> |    |        |      |     |   |   |     |   |   |
| 27/03/2009          | 10 | 13.017 | 7008 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| 03/04/2009          | 10 | 13.008 | 7002 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| 08/04/2009          | 10 | 13.034 | 7032 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| 14/04/2009          | 10 | 13.006 | 7003 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| <i>Verano 09-10</i> |    |        |      |     |   |   |     |   |   |
| 07/04/2010          | 10 | 13.021 | 7011 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| 15/04/2010          | 10 | 13.011 | 7004 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| 27/04/2010          | 10 | 13.019 | 7014 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |
| 05/05/2010          | 10 | 13.002 | 7006 | 0   | 0 | 0 | 0   | 0 | 0 |

Tabla 8. Número total de puparios y larvas de *A. fraterculus* obtenidas de frutas de durazno, nogal y guayaba colectadas debajo de árboles de las respectivas especies frutales en Horco Molle, Tucumán, entre diciembre de 2007 y mayo de 2010.

| Especie frutal,<br>Período y Fecha de<br>colecta | <i>Anastrepha fraterculus</i> |           |                                |                               |                     |   |                   |   |
|--|-------------------------------|-----------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------|---|-------------------|---|
|  | Frutos colectados             |           | Nº total de puparios obtenidos | Nº total de larvas pbttenidas | Puparios infectados |   | Larvas infectadas |   |
|  | (total)<br>Nº                 | Peso (gr) |                                |                               | Nº                  | % | Nº                | % |
| <b>Durazno</b>                                   |                               |           |                                |                               |                     |   |                   |   |
| <i>Verano 07-08</i>                              |                               |           |                                |                               |                     |   |                   |   |
| 28/12/2007                                       | 125                           | 3595      | 0                              | 50                            | 0                   | 0 | 0                 | 0 |
| 03/01/2008                                       | 43                            | 1847      | 0                              | 6                             | 0                   | 0 | 0                 | 0 |
| <i>Verano 08-09</i>                              |                               |           |                                |                               |                     |   |                   |   |

|                     |     |      |   |     |   |   |   |     |
|---------------------|-----|------|---|-----|---|---|---|-----|
| 23/12/2008          | 130 | 5574 | 0 | 56  | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 29/12/2008          | 96  | 2945 | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 13/01/2009          | 34  | 1402 | 0 | 34  | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 22/01/2009          | 32  | 1590 | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| <i>Verano 09-10</i> |     |      |   |     |   |   |   |     |
| 28/12/2009          | 120 | 4275 | 0 | 34  | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 05/01/2010          | 9   | 350  | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 13/01/2010          | 15  | 722  | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 20/01/2010          | 15  | 561  | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| <b>Nogal</b>        |     |      |   |     |   |   |   |     |
| <i>Verano 08-09</i> |     |      |   |     |   |   |   |     |
| 29/12/2008          | 112 | 2181 | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 13/01/2009          | 131 | 2417 | 0 | 2   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 22/01/2009          | 65  | 1503 | 0 | 32  | 0 | 0 | 2 | 6,3 |
| 29/01/2009          | 31  | 746  | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| <i>Verano 09-10</i> |     |      |   |     |   |   |   |     |
| 05/01/2010          | 57  | 1218 | 0 | 43  | 0 | 0 | 3 | 7   |
| 13/01/2010          | 103 | 2267 | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 20/01/2010          | 138 | 2869 | 0 | 10  | 0 | 0 | 3 | 30  |
| 26/01/2010          | 99  | 1911 | 0 | 149 | 0 | 0 | 0 | 0   |
| <b>Guayaba</b>      |     |      |   |     |   |   |   |     |
| <i>Verano 07-08</i> |     |      |   |     |   |   |   |     |
| 27/03/2008          | 150 | 6827 | 0 | 3   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 03/04/2008          | 137 | 6468 | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| <i>Verano 08-09</i> |     |      |   |     |   |   |   |     |
| 27/03/2009          | 90  | 3475 | 0 | 83  | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 03/04/2009          | 98  | 3540 | 0 | 88  | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 08/04/2009          | 120 | 4711 | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 14/04/2009          | 100 | 3626 | 0 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| <i>Verano 09-10</i> |     |      |   |     |   |   |   |     |
| 07/04/2010          | 85  | 3595 | 0 | 228 | 0 | 0 | 9 | 4   |
| 15/04/2010          | 48  | 1847 | 0 | 3   | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 27/04/2010          | 44  | 1590 | 0 | 123 | 0 | 0 | 0 | 0   |
| 05/05/2010          | 15  | 693  | 0 | 9   | 0 | 0 | 0 | 0   |

Tabla 9. Número total de puparios y larvas de *C. capitata* obtenidas de frutas de durazno, nogal y guayaba colectadas debajo de árboles de las respectivas especies frutales en Horco Molle, Tucumán, entre diciembre de 2007 y mayo de 2010.

| Especie<br>frutal,<br>Período y Fecha de<br>colecta | Frutos colectados |              | <i>Ceratitis capitata</i>            |                                    |                        |   |                      |   |
|---|-------------------|--------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------|---|----------------------|---|
|   | (total)           |              | Nº total de<br>puparios<br>obtenidos | Nº total de<br>larvas<br>obtenidas | Puparios<br>infectados |   | Larvas<br>infectadas |   |
|   | Nº                | Peso<br>(gr) |                                      |                                    | Nº                     | % | Nº                   | % |
| <b>Durazno</b>                                      |                   |              |                                      |                                    |                        |   |                      |   |
| <i>Verano 07-08</i>                                 |                   |              |                                      |                                    |                        |   |                      |   |
| 28/12/2007  | 125               | 3595         | 0                                    | 1                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 03/01/2008  | 43                | 1847         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| <i>Verano 08-09</i>                                 |                   |              |                                      |                                    |                        |   |                      |   |
| 23/12/2008  | 130               | 5574         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 29/12/2008  | 96                | 2945         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 13/01/2009  | 34                | 1402         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 22/01/2009  | 32                | 1590         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| <i>Verano 09-10</i>                                 |                   |              |                                      |                                    |                        |   |                      |   |
| 28/12/2009  | 120               | 4275         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 05/01/2010  | 9                 | 350          | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 13/01/2010  | 15                | 722          | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 20/01/2010  | 15                | 561          | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| <b>Nogal</b>  |                   |              |                                      |                                    |                        |   |                      |   |
| <i>Verano 08-09</i>                                 |                   |              |                                      |                                    |                        |   |                      |   |
| 29/12/2008  | 112               | 2181         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 13/01/2009  | 131               | 2417         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 22/01/2009  | 65                | 1503         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 29/01/2009  | 31                | 746          | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| <i>Verano 09-10</i>                                 |                   |              |                                      |                                    |                        |   |                      |   |
| 05/01/2010  | 57                | 1218         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 13/01/2010  | 103               | 2267         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 20/01/2010  | 138               | 2869         | 0                                    | 2                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 26/01/2010  | 99                | 1911         | 0                                    | 11                                 | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| <b>Guayaba</b>                                      |                   |              |                                      |                                    |                        |   |                      |   |
| <i>Verano 07-08</i>                                 |                   |              |                                      |                                    |                        |   |                      |   |
| 27/03/2008  | 150               | 6827         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 03/04/2008  | 137               | 6468         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| <i>Verano 08-09</i>                                 |                   |              |                                      |                                    |                        |   |                      |   |
| 27/03/2009  | 90                | 3475         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |
| 03/04/2009  | 98                | 3540         | 0                                    | 0                                  | 0                      | 0 | 0                    | 0 |

---

|                     |     |      |   |   |   |   |   |   |
|---------------------|-----|------|---|---|---|---|---|---|
| 08/04/2009          | 120 | 4711 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14/04/2009          | 100 | 3626 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Verano 09-10</i> |     |      |   |   |   |   |   |   |
| 07/04/2010          | 85  | 3595 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15/04/2010          | 48  | 1847 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27/04/2010          | 44  | 1590 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 05/05/2010          | 15  | 693  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

---

En el Gráfico 1 se indican los valores medios del número de puparios de *A. fraterculus* recolectados, de muestras de tierra, debajo de frutos de durazno y guayaba, durante el primer periodo de colecta (verano 2007-2008) (Gráfico 1A) y el porcentaje medio de puparios infectados del total colectado (Gráfico 1B). El número de puparios por muestra de tierra colectada, debajo de frutos de guayaba, fue 8 a 10 veces mayor que el registrado de muestras de tierra recogida debajo de frutos de durazno (Gráfico 1A). Por el contrario, la proporción de puparios infectados fue 5 a 9 veces mayor en muestras de tierra recolectadas bajo frutos de durazno, que aquellas provenientes de guayaba (Gráfico 1B). No obstante, no existieron diferencias significativas entre los porcentajes de puparios infectados, obtenidos de muestras de suelo de ambas especies frutales (Gráfico 2).

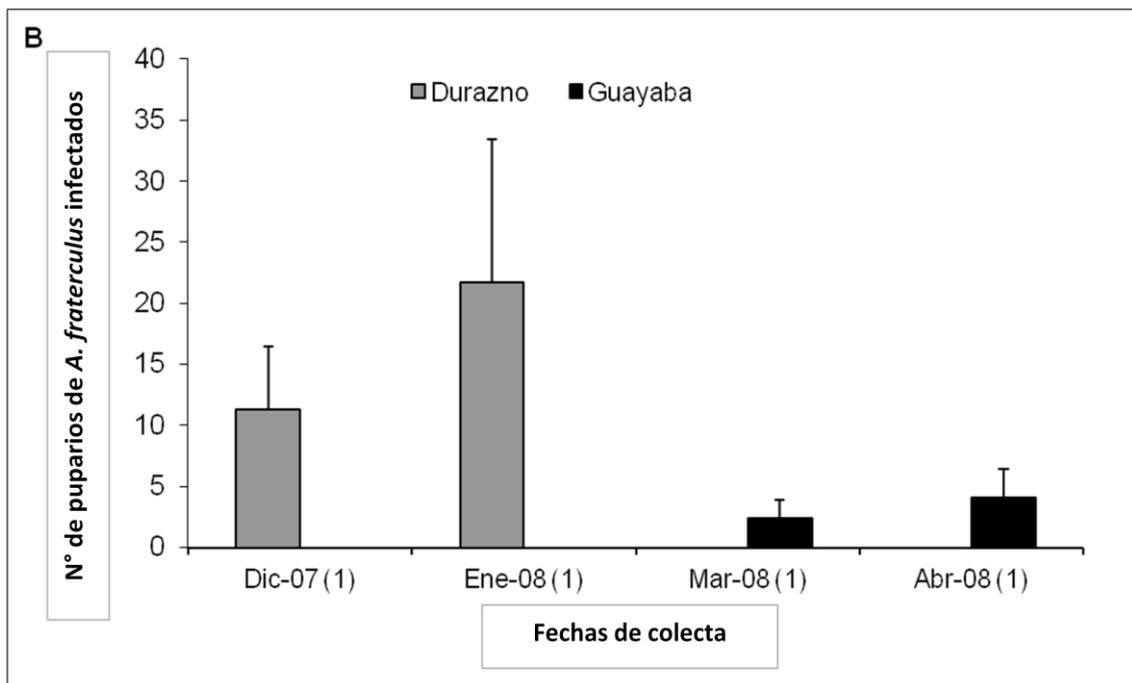
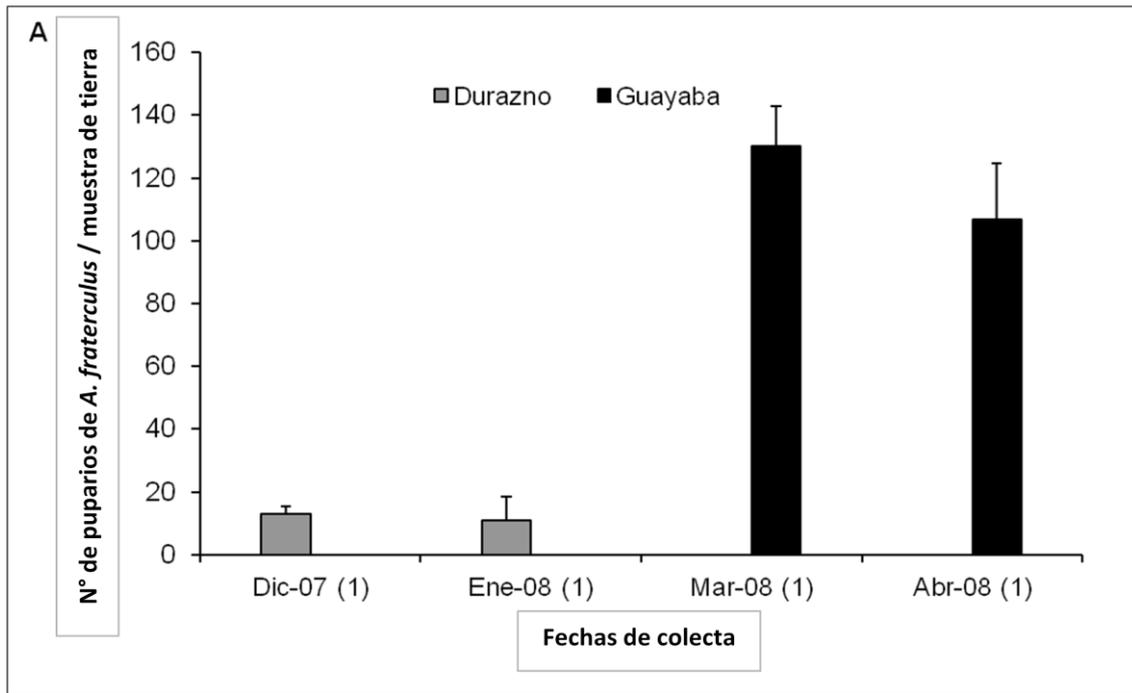


Gráfico 1. A) Número medio ( $\pm$  Error estándar de la media) de puparios de *A. fraterculus* obtenidos por muestra de tierra colectada bajo los árboles de durazno y guayaba en Horco Molle, Tucumán, entre diciembre de 2007 y abril de 2008 (verano 2007-2008); B) porcentaje ( $\pm$  Error estándar de la media) de puparios infectados con hongos sobre el total colectado en el área de estudio.

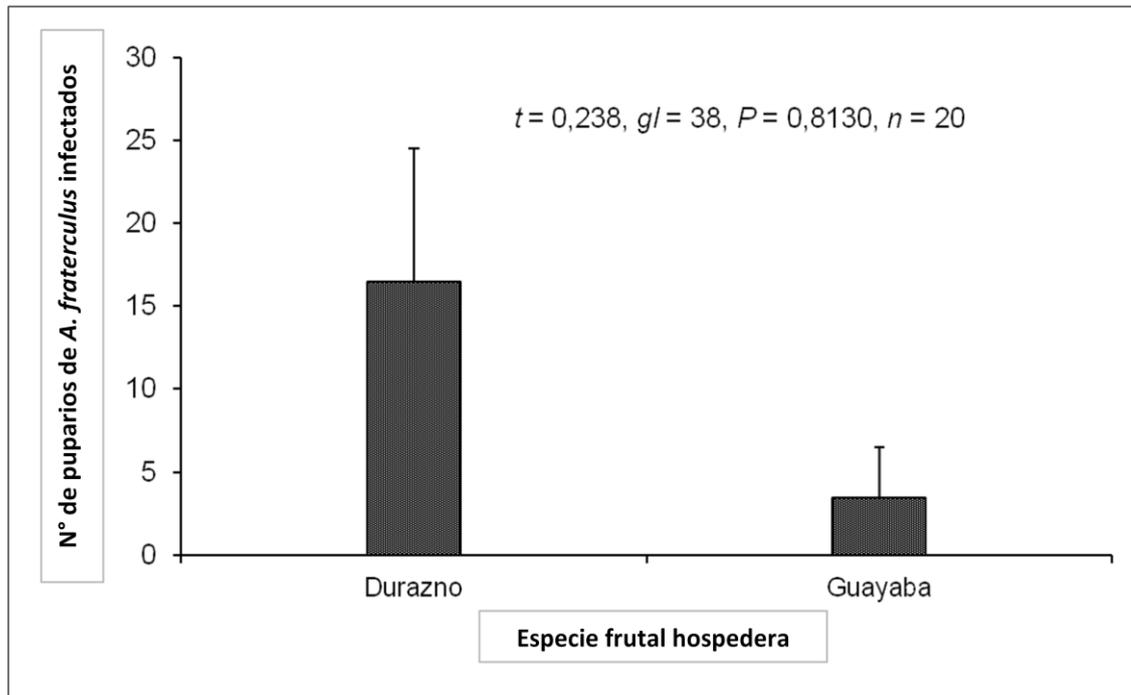


Gráfico 2. Comparación de la proporción de puparios de *A. fraterculus* infectados con hongos y recolectados de suelo debajo de frutos caídos de dos especies de plantas hospedadoras (durazno y guayaba) durante el verano 2007-2008 en la localidad de Horco Molle, Tucumán, Argentina; *t*-student,  $P = 0,05$ .

En el Gráfico 3, se indican los valores medios del número de puparios de *A. fraterculus* observados y recolectados, a partir de muestras de tierra debajo de frutos de durazno, nogal y guayaba durante el segundo periodo de colecta (verano 2008-2009) (Gráfico. 3A) y el porcentaje medio de puparios infectados del total colectado (Gráfico. 3B). El número medio de puparios por muestra de tierra, colectada debajo de frutos de guayaba, fue elevado pero muy variable con respecto a valores medios obtenidos de muestras de suelo recogidas bajo frutos de durazno y nogal (5 a 93 y 40 a 70 veces mayor que los obtenidos en durazno y nogal, respectivamente) (Gráfico. 3A). Por el contrario, la proporción de puparios infectados fue 3 a 13 y 2 veces mayor en muestras de tierra colectadas bajo frutos de durazno y nogal, respectivamente, que aquellas provenientes de guayaba (Gráfico. 3B).

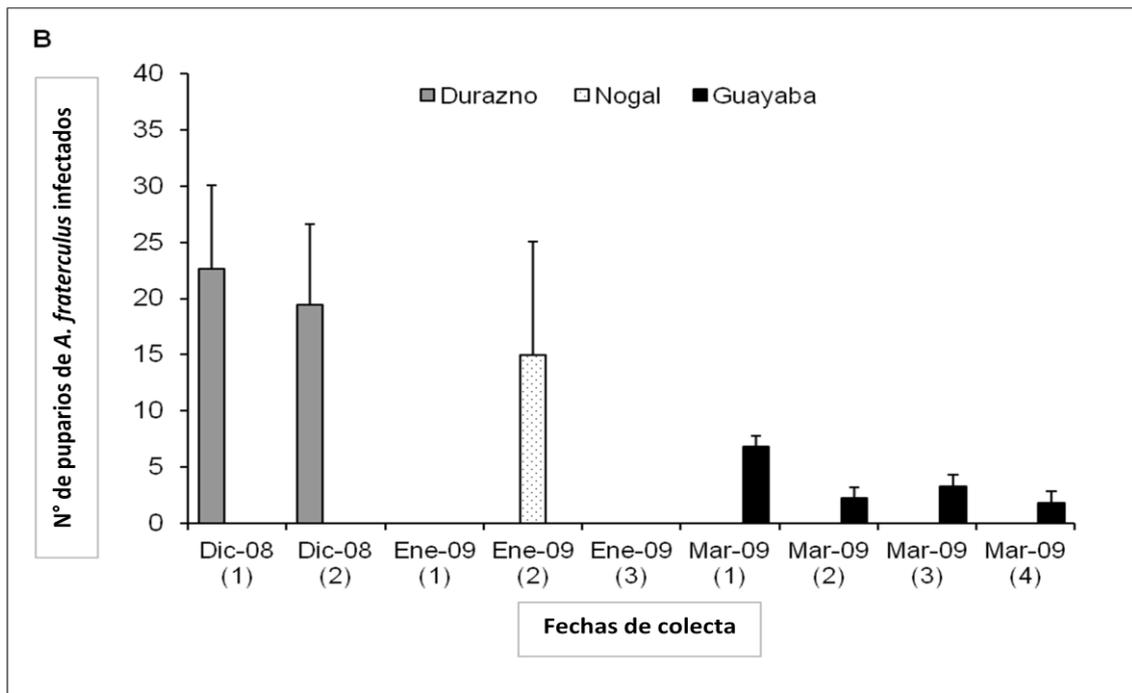
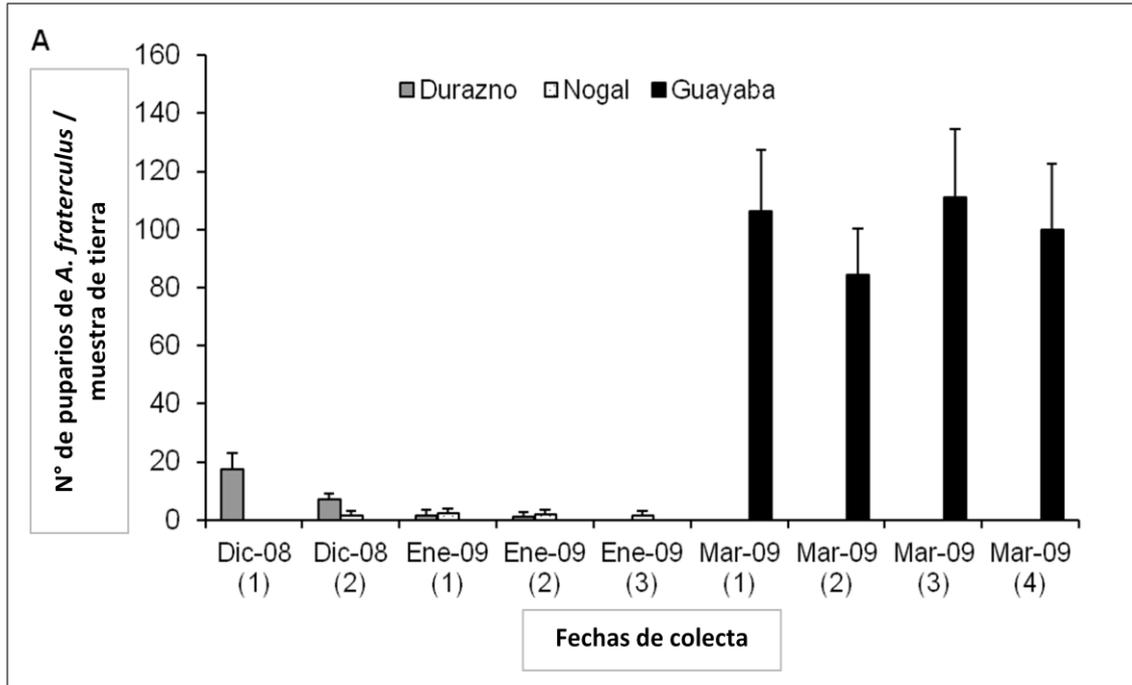
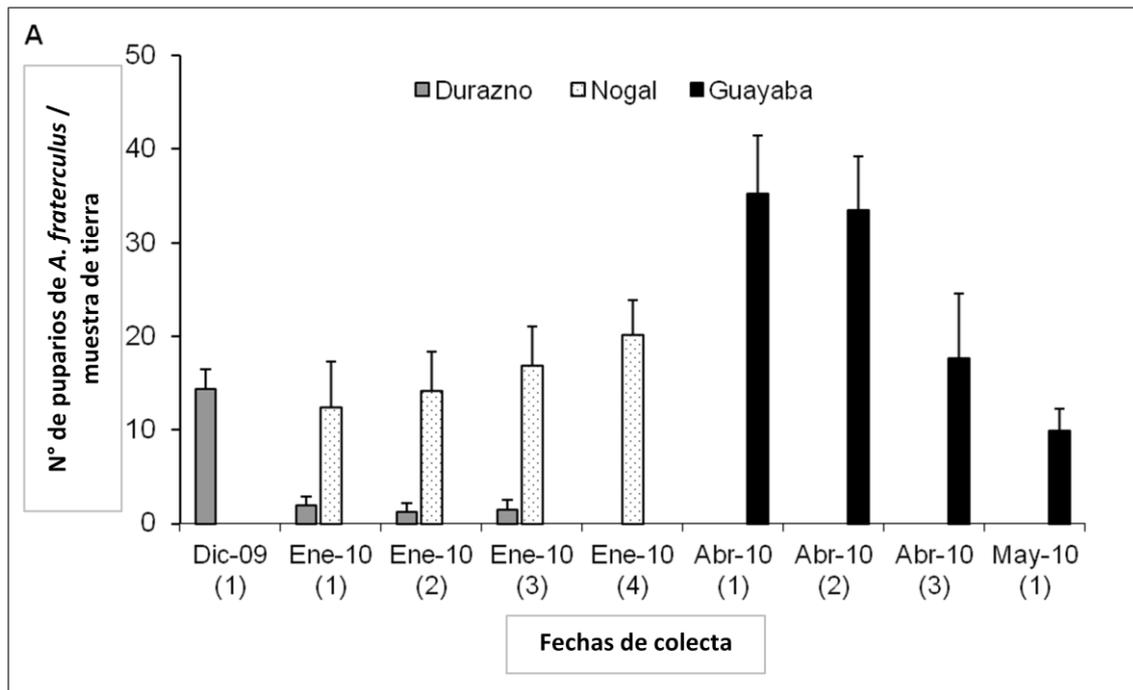


Gráfico 3. A) Número medio ( $\pm$  Error estándar de la media) de puparios de *A. fraterculus* obtenidos por muestra de tierra colectada bajo árboles de durazno, nogal y guayaba en Horco Molle, Tucumán, entre diciembre de 2008 y abril de 2009 (verano 2008-2009); B) porcentaje ( $\pm$  Error estándar de la media) de puparios infectados con hongos sobre el total colectado en el área de estudio.

En el Gráfico 4, se indican los valores medios del número de puparios de *A. fraterculus* encontrados en muestras de tierra, debajo de frutos de durazno, nogal y guayaba durante el tercer periodo de colecta (verano 2009-2010) (Gráfico. 4A) y el porcentaje medio de puparios infectados del total recolectado (Gráfico. 4B). El número medio de puparios por muestra de tierra, colectada debajo de frutos de guayaba, fue 2 a 5 y 2 a 3 veces mayor que los obtenidos de muestras de suelo recogidas bajo frutos de durazno y nogal, respectivamente (Gráfico. 4A). La proporción de puparios infectados fue 1 a 4 y 1 a 3 veces mayor en muestras de tierra colectadas bajo frutos de guayaba, que aquellas provenientes de durazno y nogal, respectivamente (Gráfico. 4B).



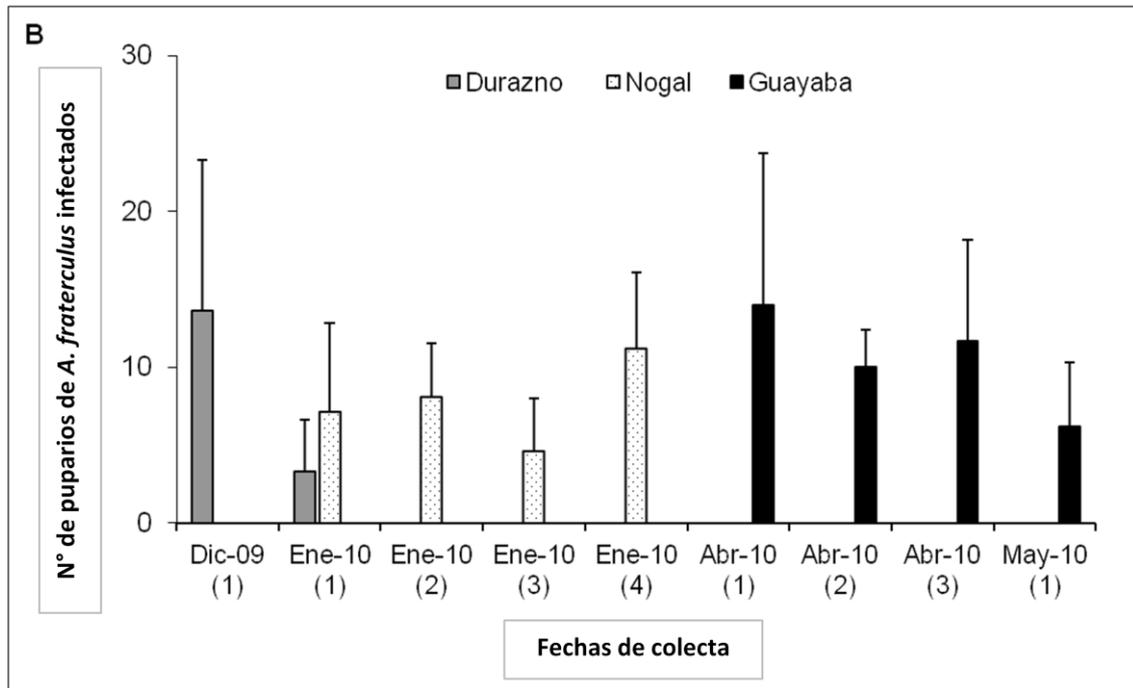
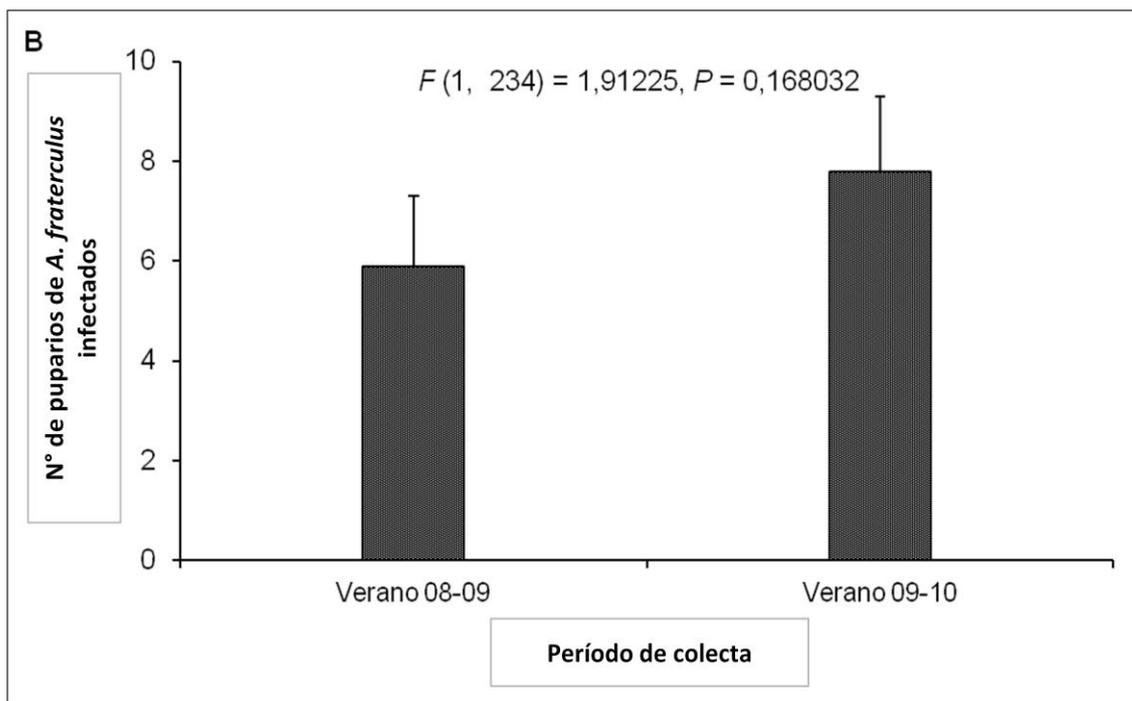
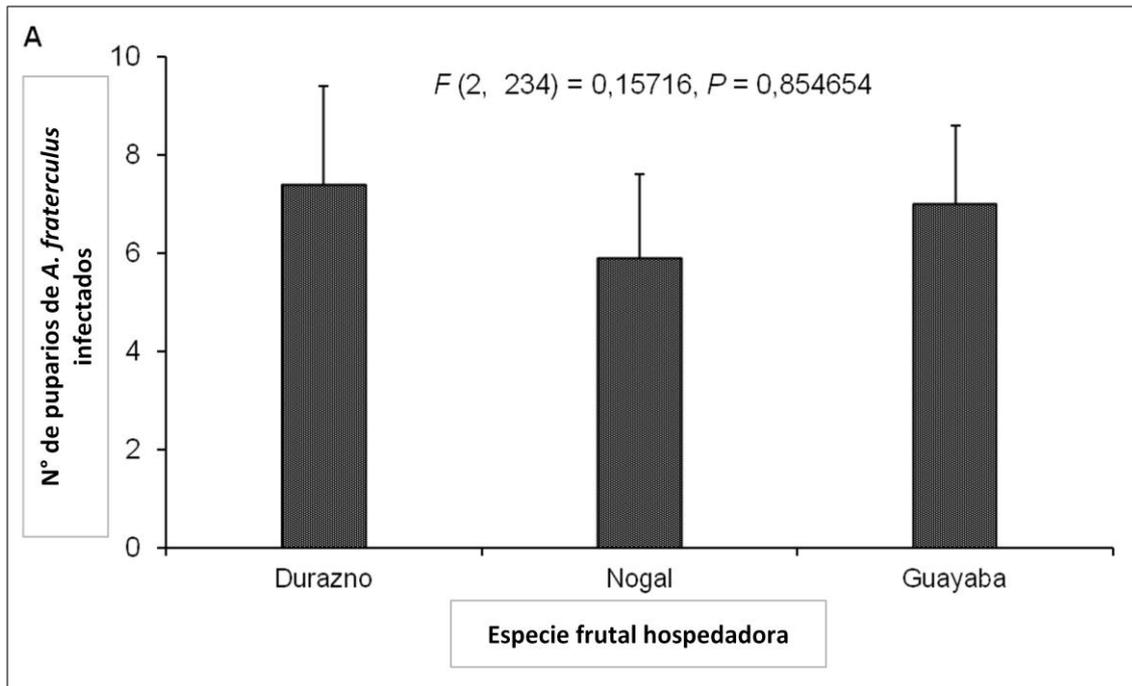


Gráfico 4. A) Número medio ( $\pm$  Error estándar de la media) de puparios de *A. fraterculus* obtenidos por muestra de tierra colectada bajo árboles de durazno, nogal y guayaba en Horco Molle, Tucumán, entre diciembre de 2009 y abril de 2010 (verano 2009-2010); B) porcentaje ( $\pm$  Error estándar de la media) de puparios infectados con hongos sobre el total colectado en el área de estudio.

El ANOVA de 2 vías realizado indicó que, no existieron diferencias significativas entre los porcentajes de puparios infectados registrados de muestras de tierra, ya sea entre las tres especies frutales (Gráfico. 5A), o entre los dos periodos de colecta (Gráfico. 5B) o entre la interacción de ambos factores (Gráfico. 5C).



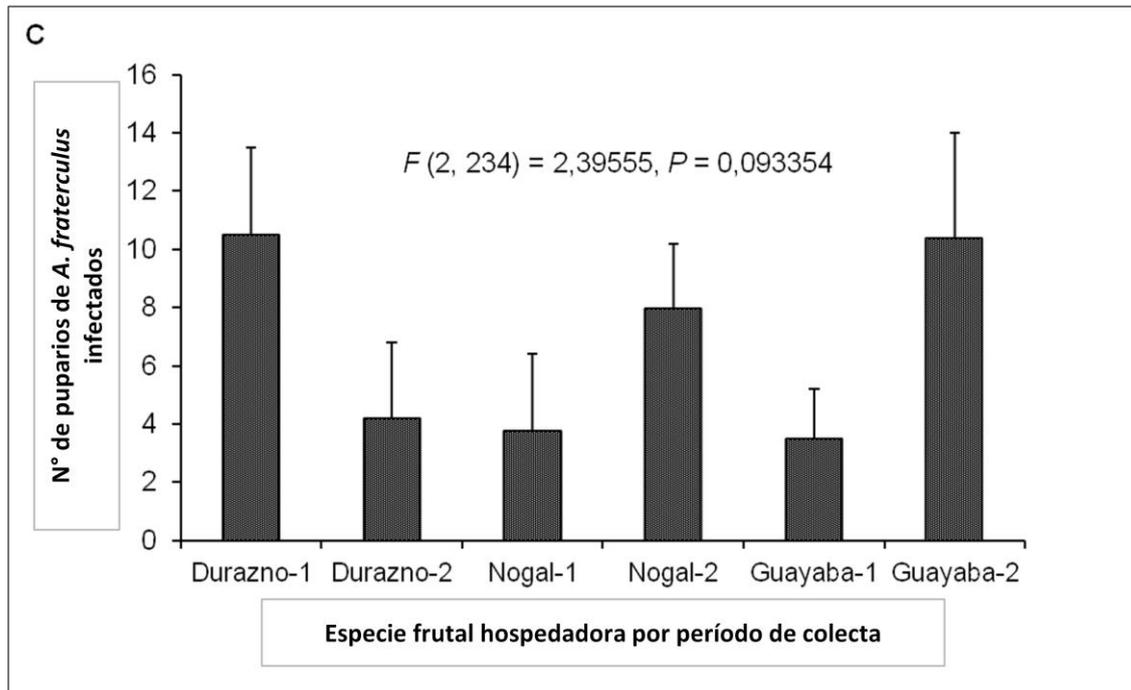
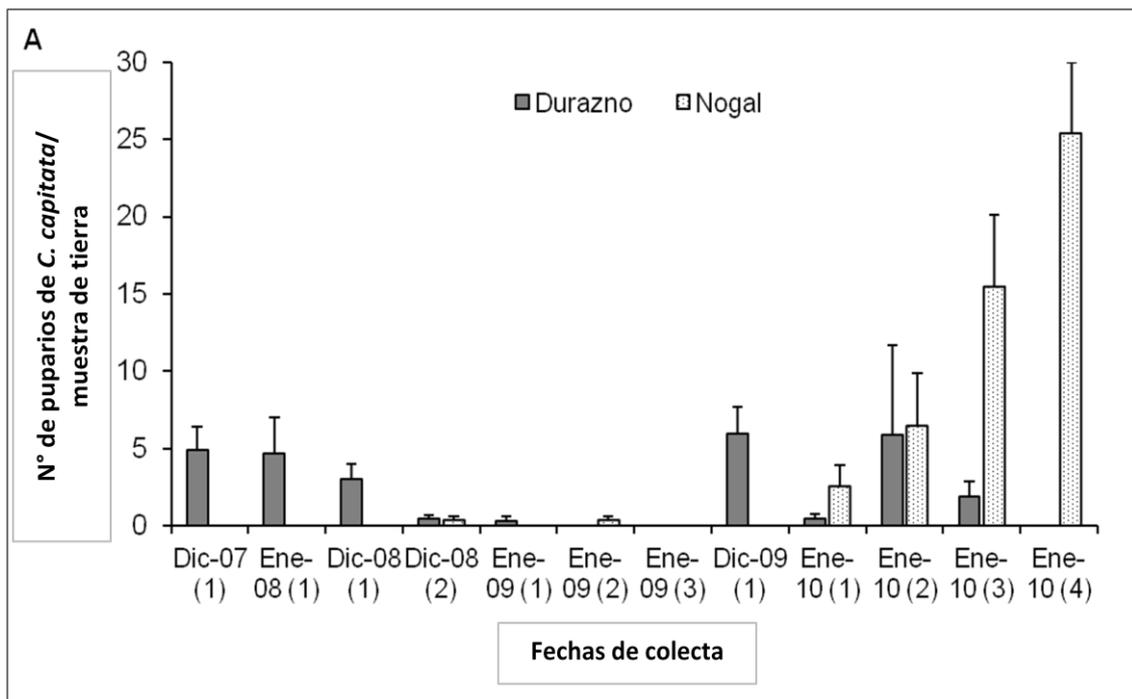


Gráfico 5. Proporción de puparios de *A. fraterculus* infectados con hongos y recolectados de suelo debajo de frutos caídos de tres especies de plantas hospedadoras (durazno, nogal y guayaba) durante los veranos 2008-2009 (1) y 2009-2010 (2) en la localidad de Horco Molle, Tucumán, Argentina; A) factor especie frutal; B) factor período de colecta; C) interacción entre ambos factores; ANOVA,  $P = 0,05$ .

En el Gráfico 6, se indican los valores medios del número de puparios de *C. capitata*, obtenidos de muestras de tierra recolectadas debajo de frutos de durazno y nogal, durante los tres periodos de colecta (Gráfico. 6A) y el porcentaje medio de puparios infectados del total colectado (Gráfico. 6B). No se obtuvieron puparios de *C. capitata* de las muestras de tierra recolectadas debajo de los frutos de guayaba. El número medio de puparios, por muestra de tierra colectada debajo de frutos de nogal, fue muy variable entre los distintos periodos de muestreo. En los dos primeros periodos, el número medio de puparios fue inferior a 0,5, mientras que en el tercer periodo de colecta varió entre 2,5 y 25,5 (Gráfico. 6A). En el caso de las muestras de tierra debajo de frutos de durazno, el número medio de puparios obtenidos fue más uniforme a lo largo de los tres periodos de colecta. El máximo valor medio fue de 6 puparios por muestra de tierra (Gráfico. 6A). En general, el porcentaje medio de puparios infectados obtenidos de muestras de suelo recogidas debajo de frutos de durazno fue 2,6 veces mayor que el registrado en muestras de tierra

colectadas debajo de frutos de nogal (Gráfico. 6B). No obstante, el ANOVA de 2 vías mostró inexistencia de diferencias significativas entre los porcentajes de puparios infectados registrados de muestras de tierra, ya sea entre ambas especies frutales (Gráfico. 7A), o entre los dos últimos periodos de colecta (verano 2008-2009 y 2009-2010) (Gráfico. 7B) o entre la interacción de ambos factores (Gráfico. 7C).



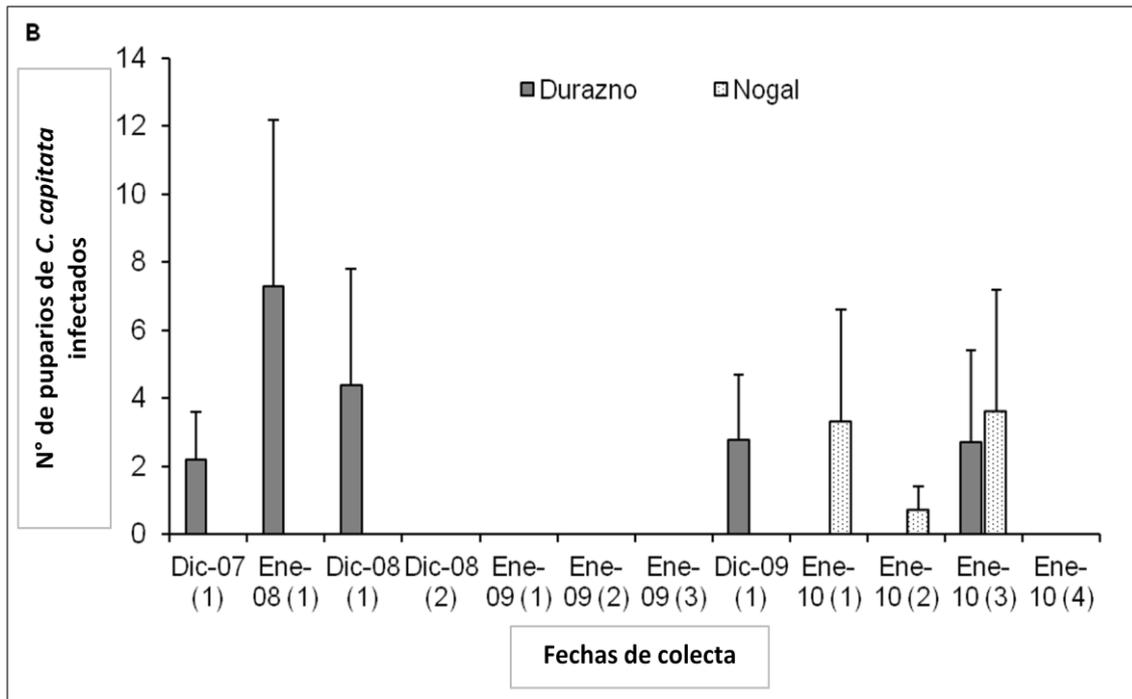
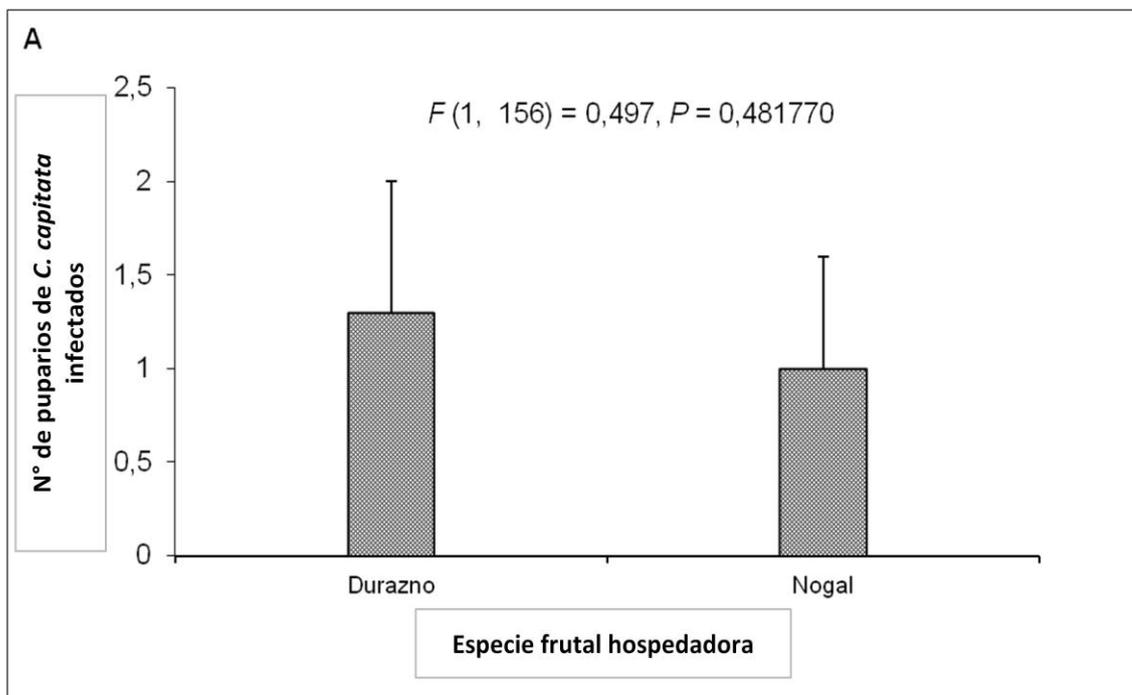


Gráfico 6. A) Número medio ( $\pm$  Error estándar de la media) de puparios de *C. capitata* obtenidos por muestra de tierra colectada bajo árboles de durazno y nogal en Horco Molle, Tucumán, entre diciembre de 2007 y abril de 2010 (veranos 2007-2008, 2008-2009 y 2009-2010); B) porcentaje ( $\pm$  Error estándar de la media) de puparios infectados con hongos sobre el total colectado en el área de estudio.



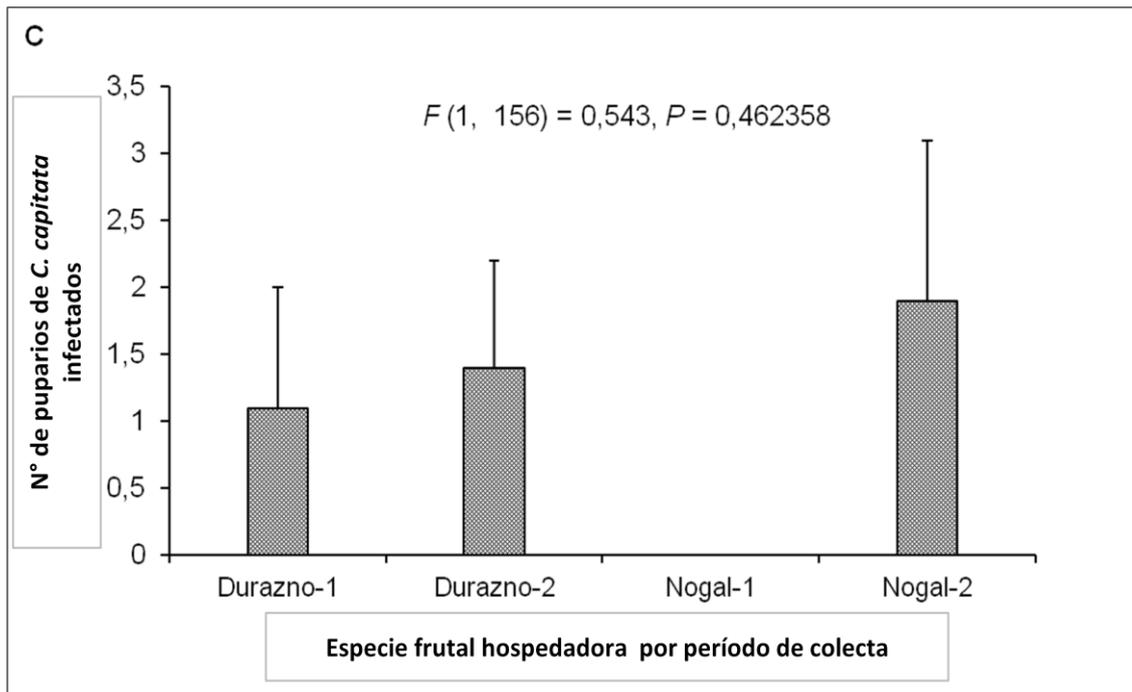
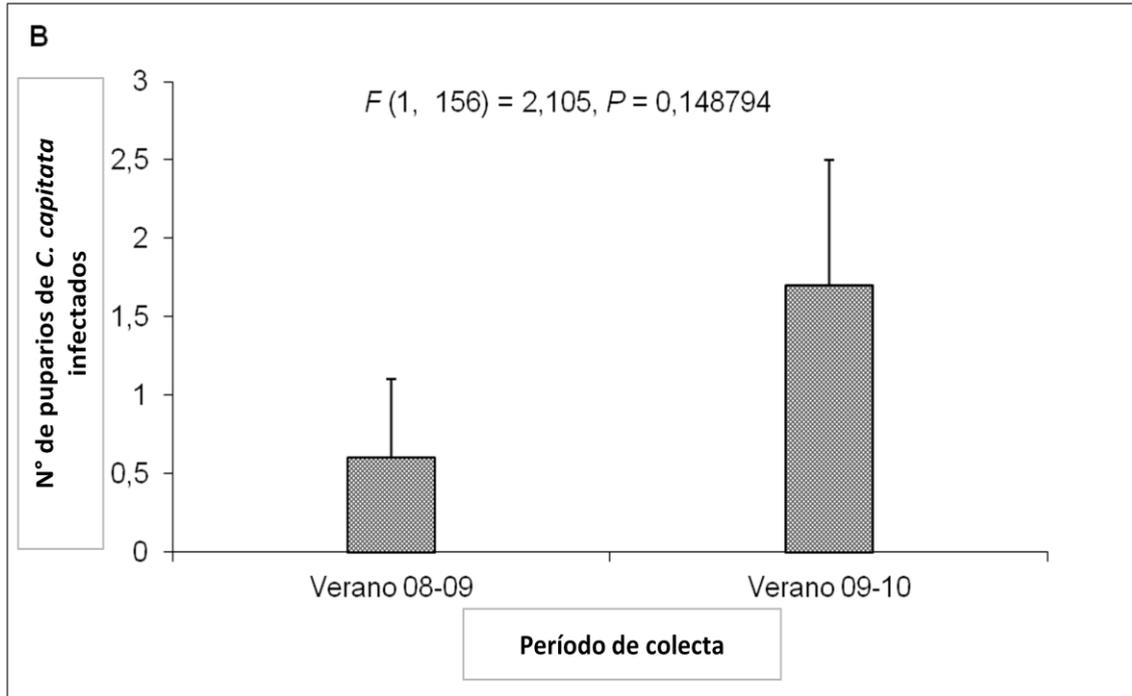


Gráfico 7. Comparación de la proporción de puparios de *C. capitata* infectados con hongos y colectados de suelo debajo de frutos caídos de dos especies de plantas hospedadoras (durazno y nogal) durante los veranos 2008-2009 y 2009-2010 en la localidad de Horco Molle, Tucumán, Argentina; A) factor especie frutal; B) factor período de colecta; C) interacción entre ambos factores; ANOVA,  $P = 0,05$ .

La proporción de puparios de *A. fraterculus* infectados provenientes de muestras de tierra recogidas debajo de frutos de durazno y nogal durante los tres periodos de colecta fue 5 y 6 veces significativamente más alta que la proporción de puparios de *C. capitata* obtenidas de estas muestras (Gráfico. 8).

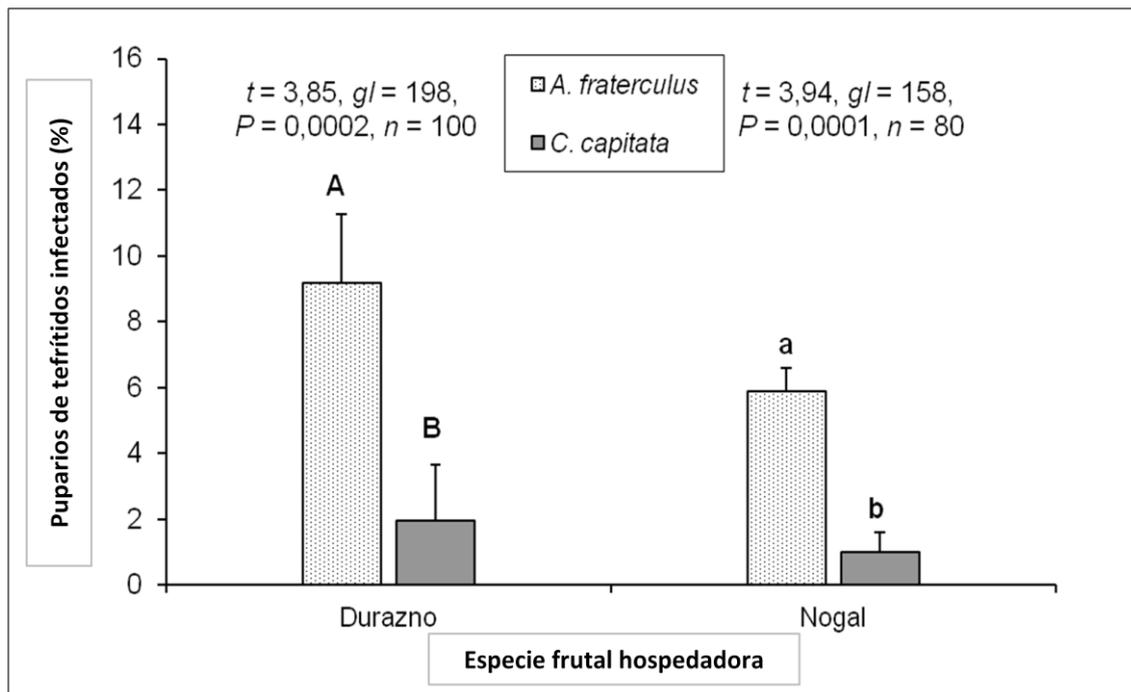
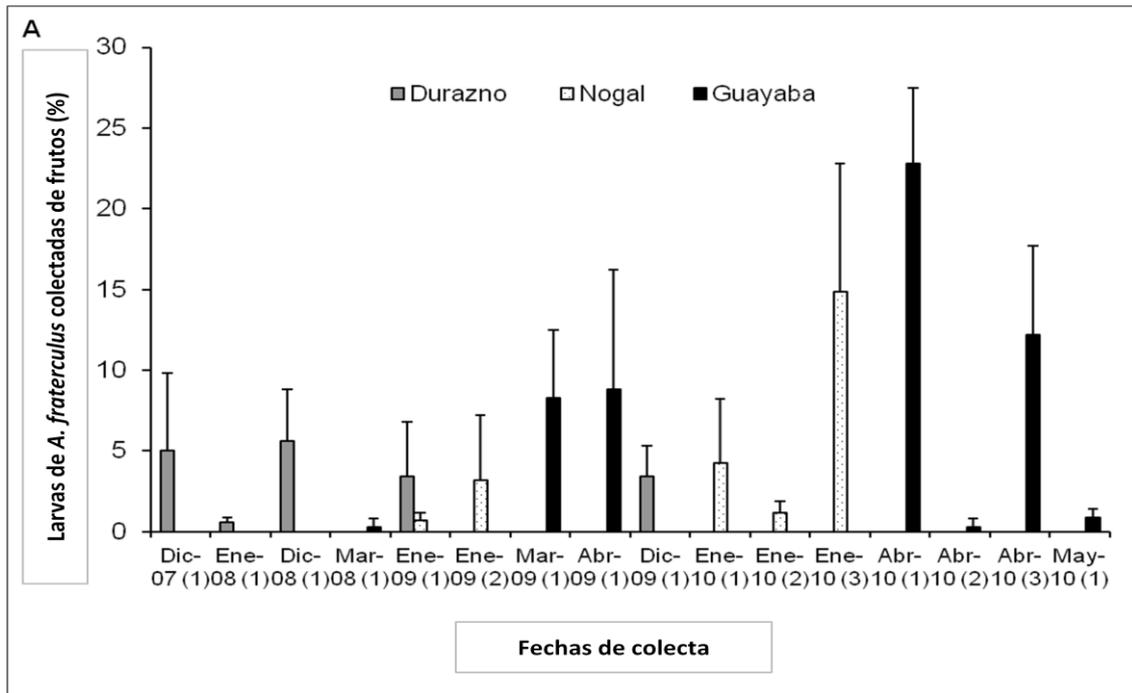


Gráfico 8. Comparación entre la proporción de puparios de *A. fraterculus* y *C. capitata* infectados con hongos y colectados de suelo debajo de frutos caídos de dos especies de plantas hospedadoras (durazno y nogal) durante los veranos 2008-2009 y 2009-2010 en la localidad de Horco Molle, Tucumán, Argentina; *t*-student,  $P = 0,05$ .

En el Gráfico 9 se indican los valores medios del número de larvas de *A. fraterculus* encontrados en el interior de frutos de durazno, nogal y guayaba durante los tres períodos de colecta (Gráfico. 9A) y el porcentaje medio de puparios infectados del total colectado (Gráfico. 9B). Solo se encontró una larva de *C. capitata* en frutos. Los valores medios de larvas por fruto de durazno, nogal y guayaba variaron de 0 a 6, de 0 a 15 y de 0 a 23, respectivamente. En general, el número medio de larvas en guayaba fue 3 y 2,2 veces mayor que el registrado en durazno y nogal, respectivamente.

Mientras que el número medio de larvas por fruto de nogal fue 1,3 veces mayor que el obtenido de frutos de durazno (Gráfico. 9A). La proporción media de larvas infestadas por fruto fue baja, no superó el 9% en nogal y el 5% en guayaba (Gráfico. 9B). No se encontraron larvas infestadas dentro de frutos de durazno.



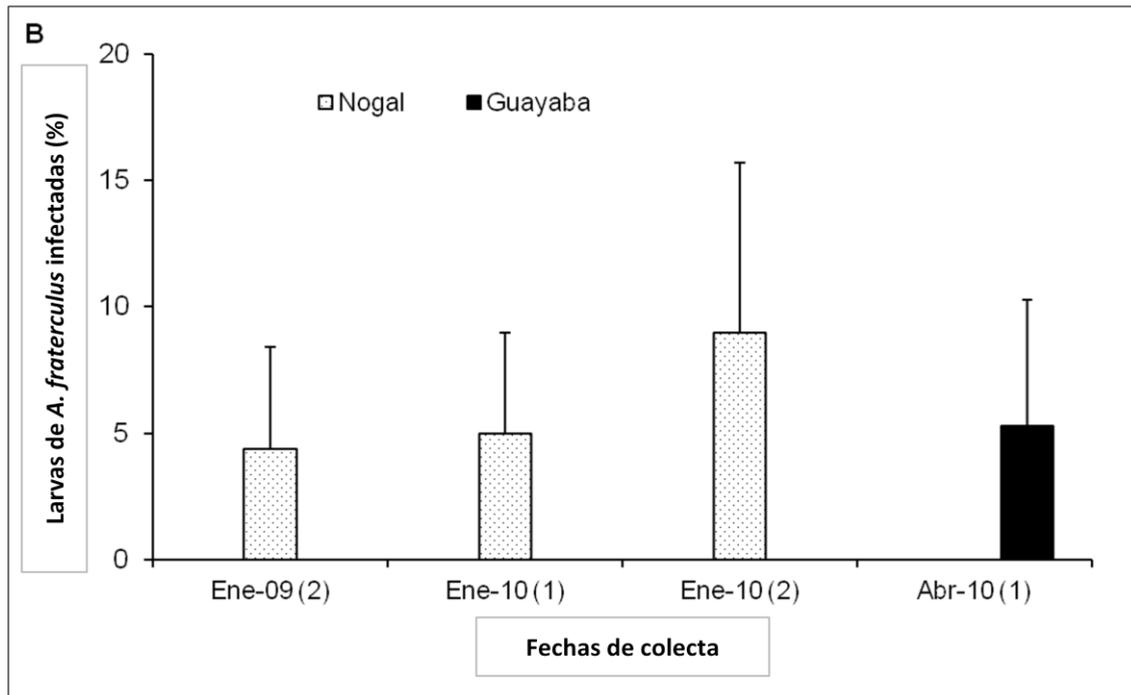


Gráfico 9. A) Número medio ( $\pm$  Error estándar de la media) de larvas de *A. fraterculus* encontradas por fruto de de durazno, nogal y guayaba en Horco Molle, Tucumán, entre diciembre de 2007 y abril de 2010 (veranos 2007-2008, 2008-2009 y 2009-2010); B) porcentaje ( $\pm$  Error estándar de la media) de larvas infestadas con hongos sobre el total colectado en el área de estudio.

En el Gráfico 10 se observan los porcentajes de infección causada por los aislamientos de hongos, para los tres periodos de muestreos. Corresponden al 6% y 2,7% de los puparios de *A. fraterculus* y *C. capitata*, provenientes del suelo, respectivamente. Y al 1,8% de las larvas de *A. fraterculus* recolectadas en las frutas. La especie *Fusarium* sp3 y *Penicillium* sp2 fueron las más y menos frecuentes, respectivamente. De las especies detectadas solo un 6% corresponden al hongo entomopatógeno *B. bassiana* que fue aislado de larvas de guayaba, durante el primer periodo de muestreo.

Los datos meteorológicos de temperatura media máxima y mínima y humedad relativa media máxima y mínima, registrados durante los periodos de muestreo, se presentan en el Gráfico 11. Los rangos de temperatura registrados fueron de 19,7 a 31,7°C y de 10,2 a 20,8°C para los valores máximos y mínimos, respectivamente. En cuanto a la humedad relativa, los

rangos registrados fueron de 73 a 97 y 27 a 63% para los valores máximos y mínimos, respectivamente.

La incidencia acumulada del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, fue de 0,42% en los veintidós meses de muestreo. La variación estacional no fue estimada, debido a que los aislamientos corresponden a una sola fecha de muestreo (27/03/2008).

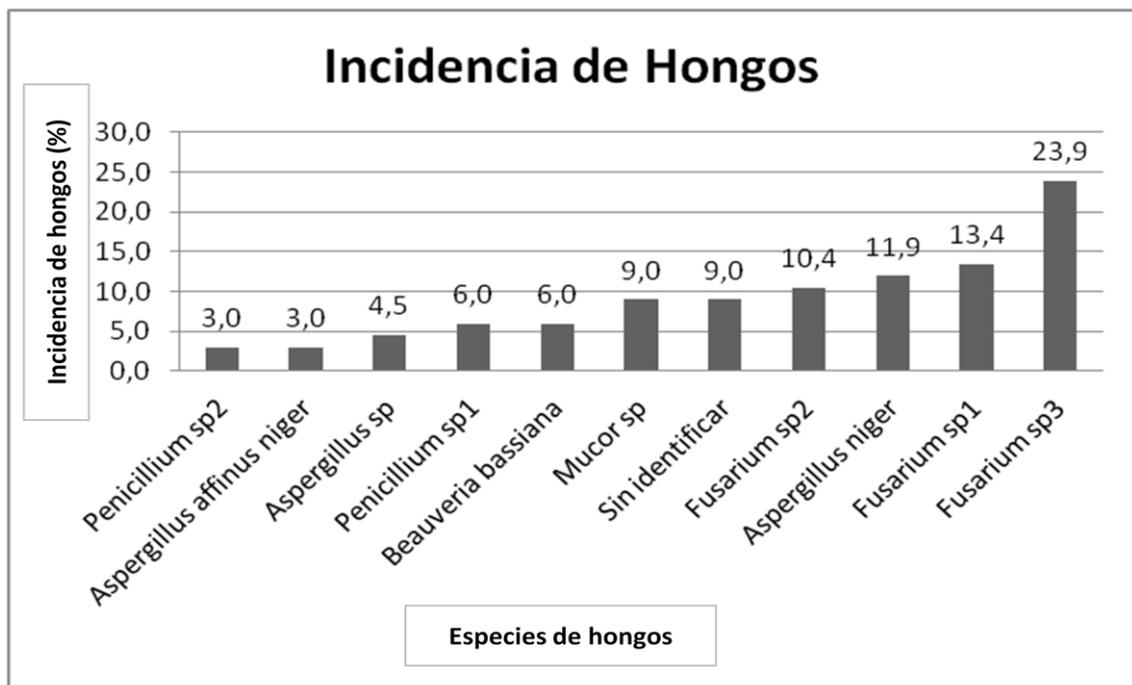


Gráfico 10. Porcentajes de incidencia de hongos sobre *A. fraterculus* y *C. capitata*

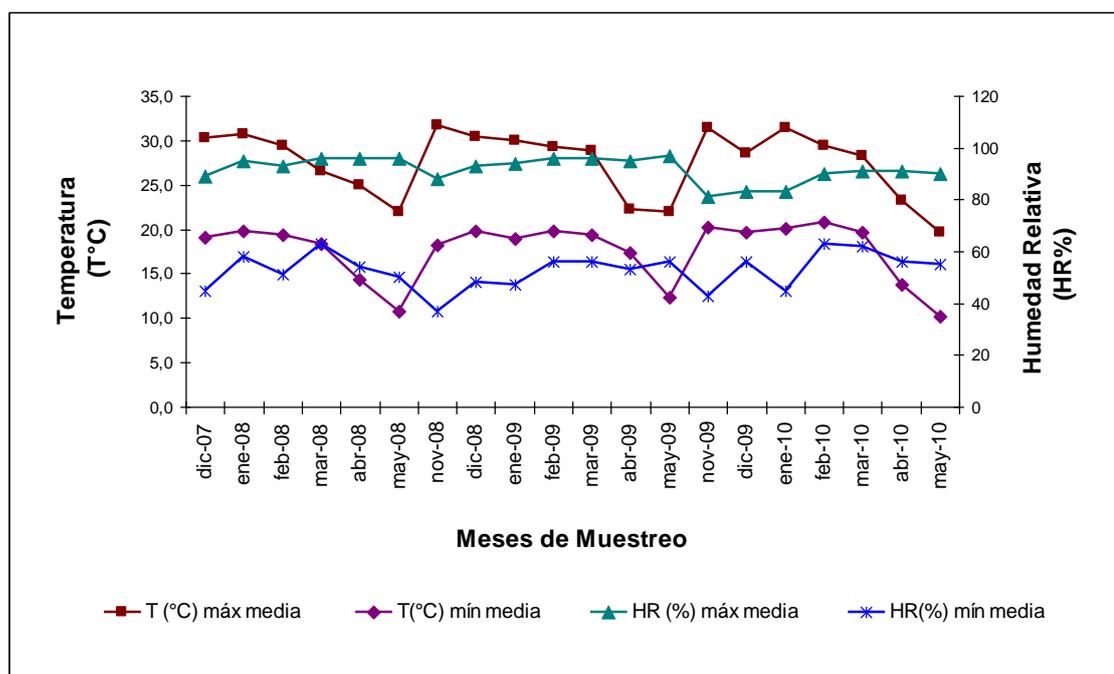


Gráfico 11. Temperatura media máxima y mínima (°C), humedad relativa media máxima y mínima (%) durante los tres periodos 2007-2008, 2008-2009 y 2009-2010.

### 4.3. Patogenicidad de cepas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* aisladas de larvas de *A. fraterculus*

#### 4.3.1. Patogenicidad contra larvas de *A. fraterculus* (inmersión)

Los ANOVAs de 2 vías indicaron diferencias significativas solo entre las cepas evaluadas (Tablas 10 y 11). Los ensayos de patogenicidad sobre los distintos estados de desarrollo de *A. fraterculus* indicaron que el estado de pupa fue el más afectado por las cuatro cepas de hongos evaluadas, seguido por el estado de larva y luego el de adulto, aunque éste último estado registró muy baja mortalidad (Gráfico 12). Las cepas CEP 321 y CEP 322 ocasionaron significativamente una mayor mortalidad de pupas de *A. fraterculus* que la registrada por la cepa CEP 323, pero ésta fue similar a la producida por la cepa CEP 324 (Gráfico 12). En el caso de larvas y adultos, las cuatro cepas produjeron mortalidades significativamente similares (Gráfico 12). Con respecto a la eficacia de las cepas, CEP 321 y CEP 322 ocasionaron una

mortalidad real (eficacia) en *A. fraterculus* significativamente mayor a la registrada por las cepas CEP 323 y CEP 324 (Gráfico 12).

Tabla 10. Resultados de los ANOVAs de dos vías sobre la mortalidad de larvas, pupas y adultos de *A. fraterculus* por acción de las cuatro cepas de hongos entomopatógenos obtenidas en condiciones naturales en un sector de Las Yungas de la provincia de Tucumán.

| FUENTE DE VARIACION      | VARIABLES DEPENDIENTES |            |                     |        |                    |                       |                      |          |
|--------------------------|------------------------|------------|---------------------|--------|--------------------|-----------------------|----------------------|----------|
|                          | gl                     | gl (Error) | % Larvas infectadas |        | % Pupas infectadas |                       | % Adultos infectados |          |
|                          |                        |            | F                   | P      | F                  | P                     | F                    | P        |
| Cepas de hongos (C)      | 3                      | 48         | 0,4775              | 0,6994 | 6,787              | < 0,0001 <sup>a</sup> | 1                    | = 0,4009 |
| Fechas de exposición (T) | 2                      | 48         | 0,502               | 0,0925 | 2,8752             | = 0,0661              | 1                    | = 0,3754 |
| C x T                    | 6                      | 48         | 0,2434              | 0,9596 | 1,4022             | = 0,2332              | 1                    | = 0,4363 |

<sup>a</sup> variable significativa

Tabla 11. Resultados de los ANOVAs de dos vías sobre la eficacia de las cepas de hongos entomopatógenos obtenidas en condiciones naturales en un sector de Las Yungas de la provincia de Tucumán en el control de *A. fraterculus*.

| FUENTE DE VARIACION      | VARIABLE RESPUESTA |            |                             |                       |
|--------------------------|--------------------|------------|-----------------------------|-----------------------|
|                          | gl                 | gl (Error) | Eficacia (%mortalidad real) |                       |
|                          |                    |            | F                           | P                     |
| Cepas de hongos (C)      | 3                  | 48         | 9,9322                      | < 0,0001 <sup>a</sup> |
| Fechas de exposición (T) | 2                  | 48         | 2,5613                      | = 0,0877              |
| C x T                    | 6                  | 48         | 1,1553                      | = 0,3457              |

<sup>a</sup> variable significativa

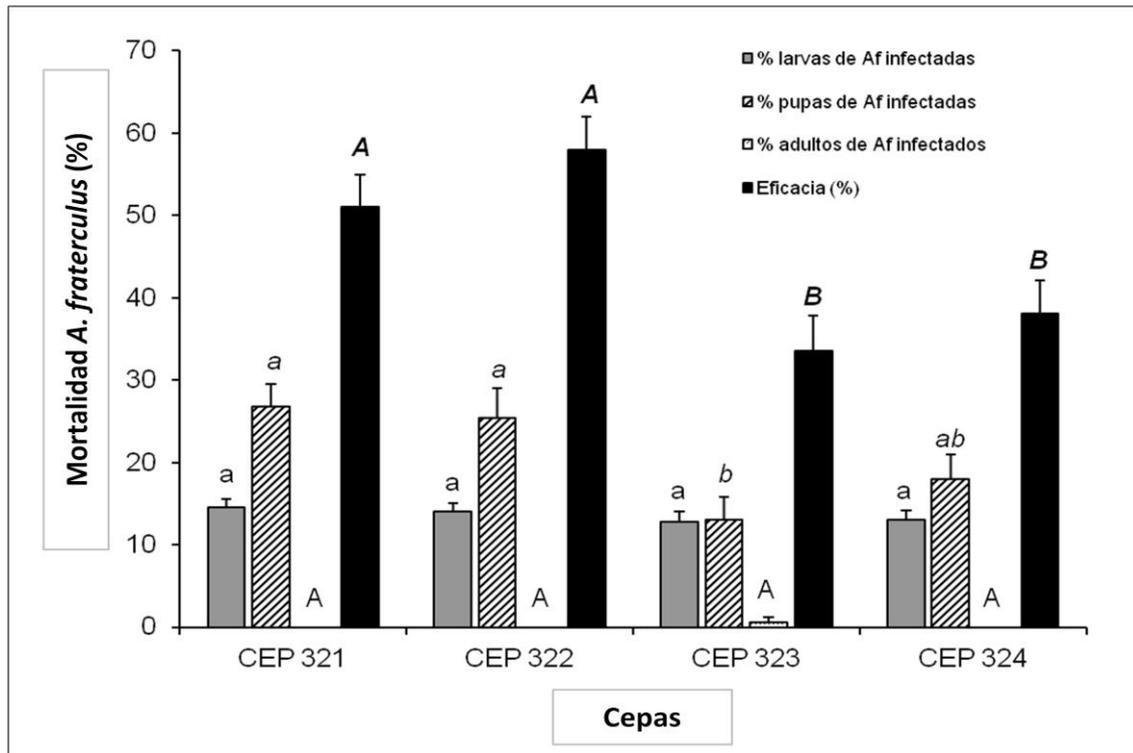


Gráfico 12. Mortalidad de larvas, pupas y adultos de *A. fraterculus* producida por las cuatro cepas de *B. bassiana* evaluadas, como así también de la eficacia de estas cepas. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas, según la Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

#### 4.3.2. Patogenicidad de *B. bassiana* contra larvas de *A. fraterculus* y *C. capitata* (espolvoreo)

En general, los ANOVAs de 2 vías indicaron diferencias significativas entre las cepas obtenidas en condiciones naturales en un sector de Las Yungas de la provincia de Tucumán, pero no entre las distintas fechas de exposición de los insectos a estas cepas (factor temporal) y tampoco en la interacción de ambos factores (Tablas 12 y 13).

Los ensayos de patogenicidad mostraron un patrón similar en *C. capitata* y en *A. fraterculus* en función de la mortalidad de los distintos estados de desarrollo evaluados. El estado de pupa, tanto en *C. capitata* como en *A. fraterculus*, fue notablemente el más afectado por las cuatro cepas de hongos evaluadas, seguido por el estado de adulto y luego el de larva (Gráficos 13 y 14). Una mortalidad significativamente mayor de pupas, de ambas especies de tefrítidos, fue producida por las cepas CEP 321 y CEP 322, mientras que la

mayor mortalidad de larvas de *A. fraterculus* y *C. capitata* la produjeron las cepas CEP 321 y CEP 324, y CEP 322 y CEP 324, respectivamente (Gráficos 13 y 14). En el caso de adultos, las cuatro cepas evaluadas ocasionaron mortalidades significativamente similares. Además, la eficacia de las cepas con respecto a la mortalidad real de la plaga, varió de manera similar en ambas especies de tefrítidos huéspedes. Las cepas CEP 321 y CEP 322 ocasionaron una mortalidad real en *A. fraterculus* (Gráfico 13) y en *C. capitata* (Gráfico 14) significativamente mayor a la registrada por las cepas CEP 323 y CEP 324 en ambas especies de tefrítidos.

Tabla 12. Resultados de los ANOVAs de dos vías sobre la mortalidad de larvas, pupas y adultos de *A. fraterculus* y *C. capitata* por acción de las cuatro cepas de hongos entomopatógenos obtenidas en condiciones naturales en un sector de Las Yungas de la provincia de Tucumán.

| ESPECIES DE TEFRÍTIDOS  | FUENTE DE VARIACION      | VARIABLES DEPENDIENTES |            |                     |                       |                    |                       |                      |          |
|-------------------------|--------------------------|------------------------|------------|---------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|----------|
|                         |                          | gl                     | gl (Error) | % Larvas infectadas |                       | % Pupas infectadas |                       | % Adultos infectados |          |
|                         |                          |                        |            | F                   | P                     | F                  | P                     | F                    | P        |
| <i>A. fraterculus</i> : |                          |                        |            |                     |                       |                    |                       |                      |          |
|                         | Cepas de hongos (C)      | 3                      | 48         | 9,983               | < 0,0001 <sup>a</sup> | 46,5982            | < 0,0001 <sup>a</sup> | 1,461                | = 0,2371 |
|                         | Fechas de exposición (T) | 2                      | 48         | 0,091               | = 0,9134              | 0,2595             | = 0,7724              | 2,481                | = 0,0943 |
|                         | C x T                    | 6                      | 48         | 0,776               | = 0,5931              | 1,1685             | = 0,1685              | 0,845                | = 0,5417 |
| <i>C. capitata</i> :    |                          |                        |            |                     |                       |                    |                       |                      |          |
|                         | Cepas de hongos (C)      | 3                      | 48         | 3,333               | = 0,0270 <sup>a</sup> | 39,4225            | < 0,0001 <sup>a</sup> | 2,567                | = 0,0653 |
|                         | Fechas de exposición (T) | 2                      | 48         | 0,933               | = 0,4003              | 1,6568             | = 0,2014              | 2,032                | = 0,1421 |
|                         | C x T                    | 6                      | 48         | 2,001               | = 0,0841              | 1,7208             | = 0,1365              | 0,499                | = 0,8061 |

<sup>a</sup> variables significativas

Tabla 13. Resultados de los ANOVAs de dos vías sobre la eficacia de las cepas de hongos entomopatógenos obtenidas en condiciones naturales en un sector de Las Yungas de la provincia de Tucumán en el control de *A. fraterculus* y *C. capitata*.

| FUENTE DE VARIACION      | ESPECIE DE TEFRITIDO / VARIABLE RESPUESTA |            |                              |                       |                              |                       |
|--------------------------|---|------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
|                          | gl  | gl (Error) | <i>A. fraterculus</i>        |                       | <i>C. capitata</i>           |                       |
|                          |   |            | Eficacia (% mortalidad real) |                       | Eficacia (% mortalidad real) |                       |
|                          |   |            | F                            | P                     | F                            | P                     |
| Cepas de hongos (C)      | 3   | 48         | 33,263                       | < 0,0001 <sup>a</sup> | 26,7704                      | < 0,0001 <sup>a</sup> |
| Fechas de exposición (T) | 2   | 48         | 0,4267                       | = 0,6551              | 1,1453                       | = 0,3266              |
| C x T                    | 6   | 48         | 0,921                        | = 0,4883              | 0,5257                       | = 0,7859              |

<sup>a</sup> variables significativas

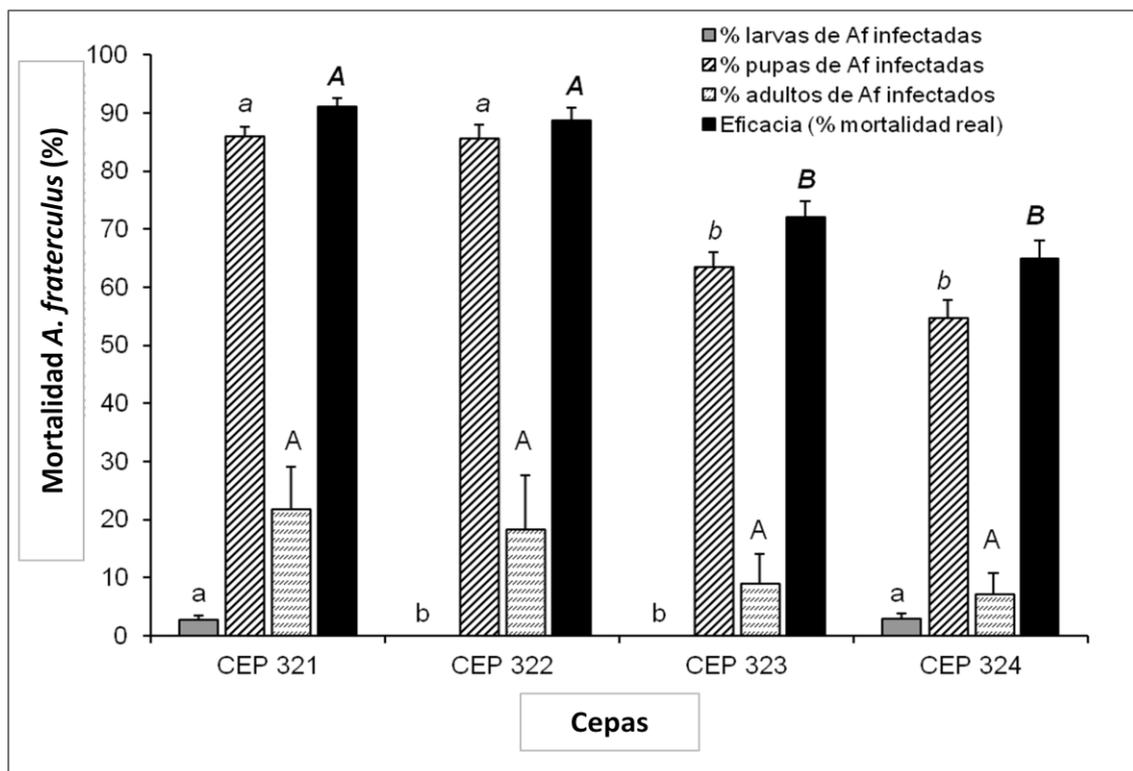


Gráfico 13. Mortalidad de larvas, pupas y adultos de *A. fraterculus* producida por las cuatro cepas de *B. bassiana* evaluadas, como así también de la eficacia de estas cepas. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre las diferentes cepas evaluadas, según el Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

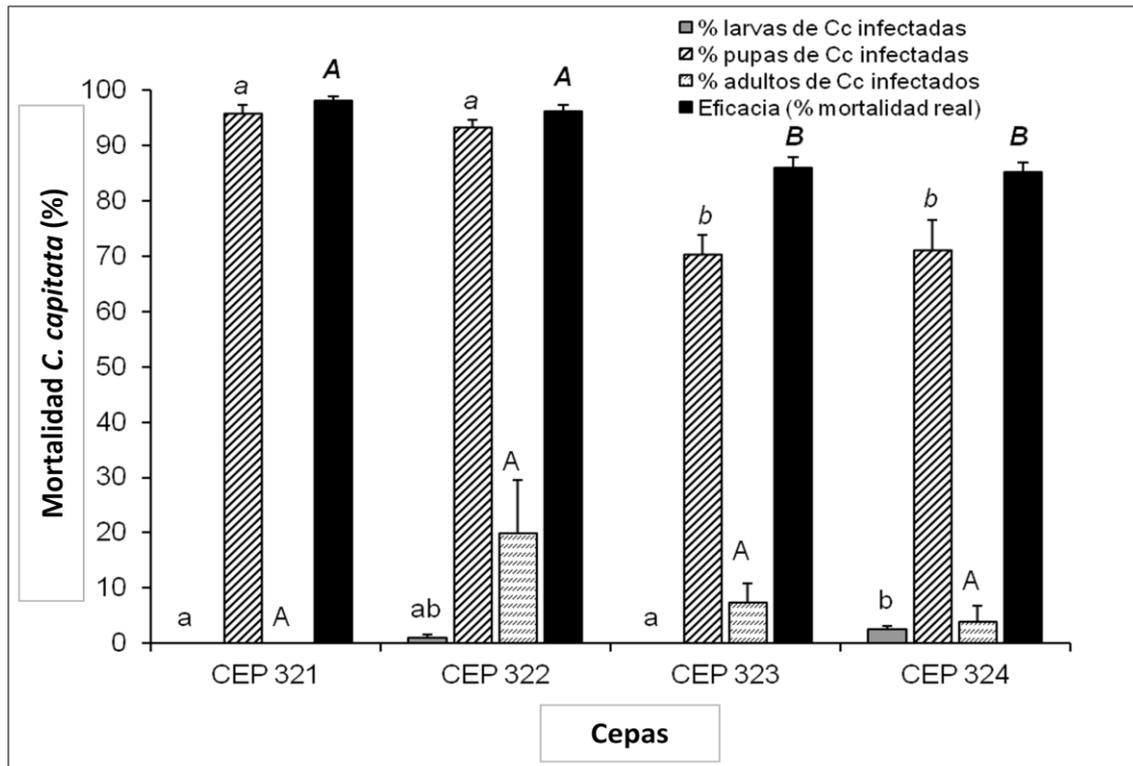


Gráfico 14. Mortalidad de larvas, pupas y adultos de *C. capitata* producida por las cuatro cepas de *B. bassiana* evaluadas, como así también de la eficacia de estas cepas. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre las diferentes cepas evaluadas, según el Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

El análisis comparativo de la mortalidad real (eficacia) en *C. capitata* y *A. fraterculus* indicó diferencias significativas entre ambas especies de tefrítidos y entre las cepas de hongos evaluadas, pero no en la interacción de estos dos factores (Tabla 14). Las cepas de *B. bassiana* en conjunto produjeron significativamente mayor mortalidad en *C. capitata* que en *A. fraterculus* (Gráfico 15). Las cepas CEP 321 y CEP 322 ocasionaron significativamente mayor mortalidad en ambas especies de tefrítidos que las restantes cepas CEP 323 y CEP 324 (Gráfico 16).

Tabla 14. Resultados de los ANOVAs de dos vías sobre la eficacia de las cepas de hongos entomopatógenos al compararla entre las dos especies de tefrítidos plaga (*C. capitata* vs *A. fraterculus*).

| FUENTE DE VARIACION        | VARIABLE RESPUESTA |            |                              |                       |
|----------------------------|--------------------|------------|------------------------------|-----------------------|
|                            | gl                 | gl (Error) | Eficacia (% mortalidad real) |                       |
|                            |                    |            | F                            | P                     |
| Especies de tefrítidos (E) | 1                  | 112        | 67,904                       | < 0,0001 <sup>a</sup> |
| Cepas de hongos (C)        | 3                  | 112        | 53,859                       | < 0,0001 <sup>a</sup> |
| E x C                      | 3                  | 112        | 0,672                        | = 0,5708              |

<sup>a</sup> variables significativas

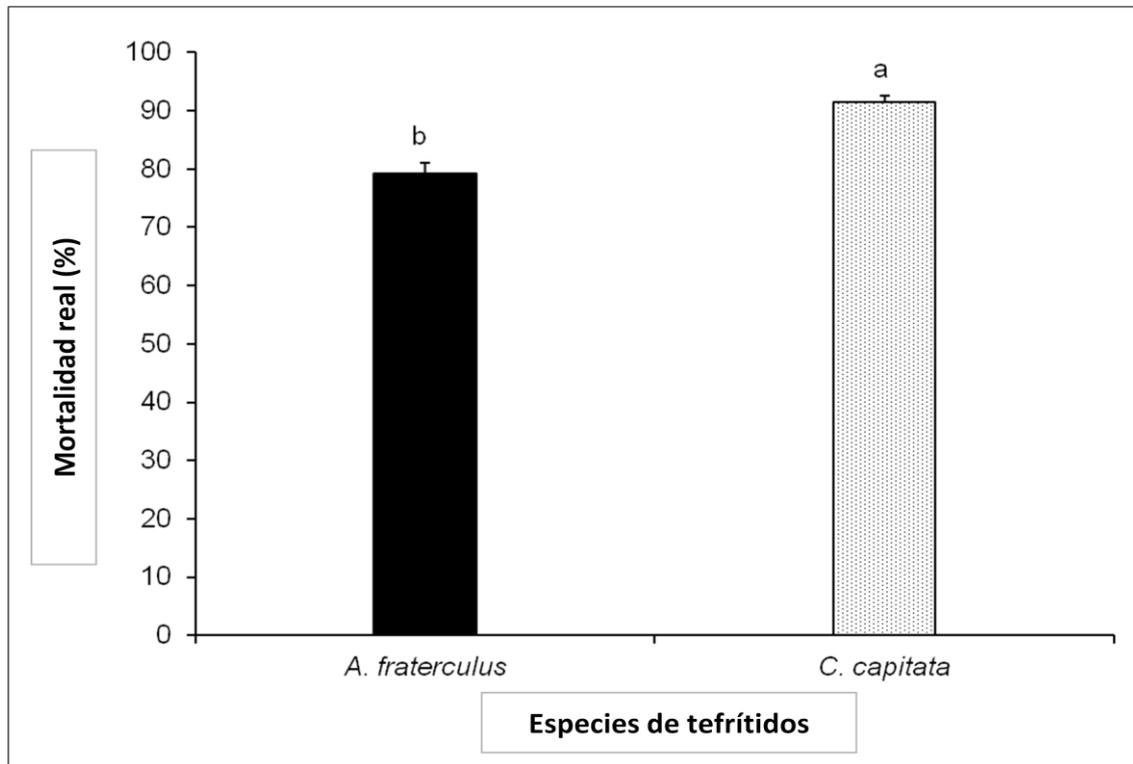


Gráfico 15. Mortalidad real (eficacia) entre *A. fraterculus* y *C. capitata* producida por las cuatro cepas de *B. bassiana* evaluadas. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre las especies de insectos plaga, según el Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

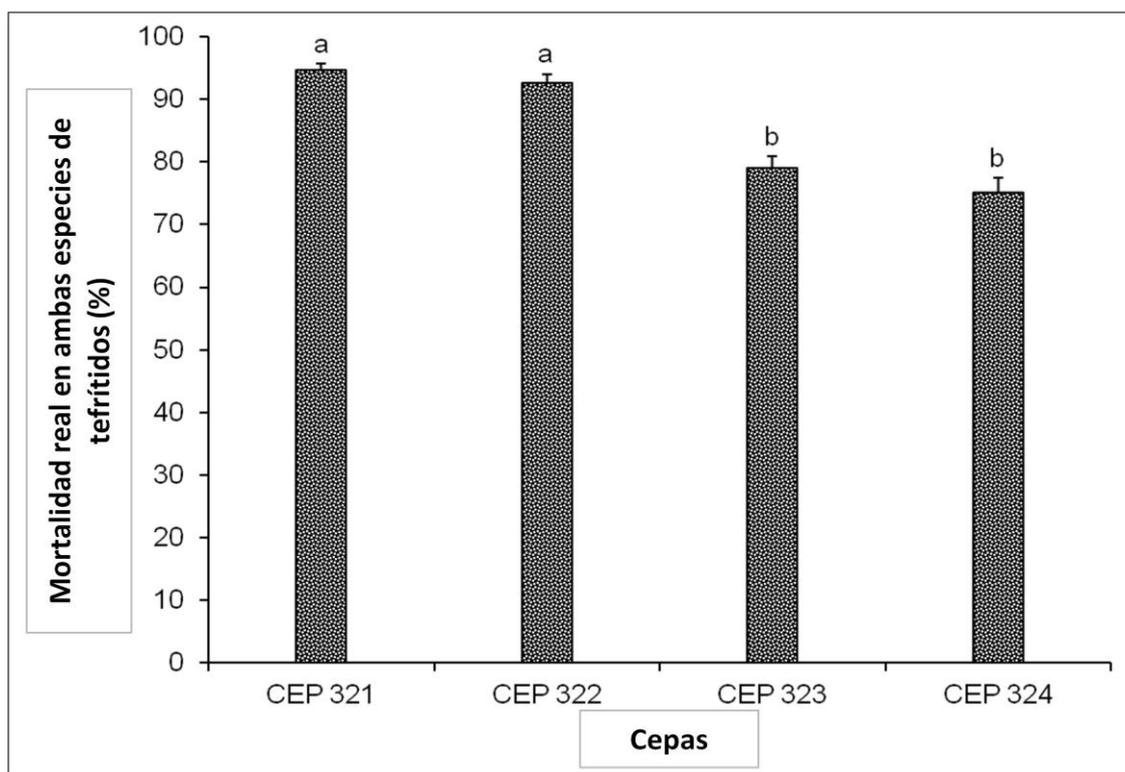


Gráfico 16. Mortalidad real (eficacia) de ambas especies de tefrítidos (*A. fraterculus* y *C. capitata*) entre las cuatro cepas de *B. bassiana* evaluadas. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre las diferentes cepas evaluadas, según el Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

#### 4.3.3. Comparación entre los dos métodos de aplicación de cepas de *B. bassiana*

Los ANOVAs de 2 vías usados para comparar los dos métodos de aplicación (inmersión y espolvoreo) sobre la mortalidad de larvas y pupas de *A. fraterculus* causada por las cepas de hongos, como así también la eficacia de estas cepas en función de la mortalidad real de la plaga, indicaron diferencias significativas no solo entre las cuatro cepas evaluadas sino también entre los métodos empleados y en la interacción de ambos factores (Tablas 15 y 16). En el caso de la mortalidad del adulto de la plaga, solo hubo diferencias significativas entre los métodos de infección utilizados (Tabla 15).

Hubo diferencia significativa en la mortalidad de pupas y adultos de *A. fraterculus* a favor del método de espolvoreo, ya que este método produjo una mortalidad de pupas y adultos 3,5 y 14 veces mayor, respectivamente, que

aquella producida por el método de inmersión (Gráfico 17). De manera similar, la eficacia del método de espolvoreo fue 1,8 veces mayor a la del método por inmersión (Gráfico 16). Por el contrario, la mortalidad de larvas producida por el método de inmersión fue 9,6 veces mayor que la ocasionada por el método de espolvoreo (Gráfico 17).

Tabla 15. Resultados de los ANOVAs de dos vías sobre la comparación de los métodos de aplicación (inmersión vs espolvoreo) con las cuatro cepas de hongos entomopatógenos usados en larvas, pupas y adultos de *A. fraterculus*.

| FUENTE DE VARIACION      | VARIABLES DEPENDIENTES |            |                     |                       |                    |                       |                      |                       |
|--------------------------|------------------------|------------|---------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
|                          | gl                     | gl (Error) | % larvas infectadas |                       | % pupas infectadas |                       | % adultos infectados |                       |
|                          |                        |            | F                   | P                     | F                  | P                     | F                    | P                     |
| Cepas de hongos (C)      | 3                      | 112        | 3,784               | < 0,0001 <sup>a</sup> | 28,583             | < 0,0001 <sup>a</sup> | 1,035                | 0,3798                |
| Métodos de infección (M) | 1                      | 112        | 441,8               | < 0,0001 <sup>a</sup> | 568,641            | < 0,0001 <sup>a</sup> | 25,76                | < 0,0001 <sup>a</sup> |
| C x M                    | 3                      | 112        | 3,039               | = 0,0320 <sup>a</sup> | 3,989              | = 0,0096 <sup>a</sup> | 1,38                 | 0,2526                |

<sup>a</sup> variables significativas

Tabla 16. Resultados de los ANOVAs de dos vías relacionados a la comparación de los métodos de aplicación (espolvoreo vs inmersión) con respecto a la eficacia de las cuatro cepas de hongos entomopatógenos evaluadas en *A. fraterculus*.

| FUENTE DE VARIACION      | VARIABLE RESPUESTA |            |          |                       |
|--------------------------|--------------------|------------|----------|-----------------------|
|                          | gl                 | gl (Error) | Eficacia | (%mortalidad real)    |
|                          |                    |            | F        | P                     |
| Cepas de hongos (C)      | 3                  | 112        | 28,331   | < 0,0001 <sup>a</sup> |
| Métodos de infección (M) | 1                  | 112        | 255,447  | < 0,0001 <sup>a</sup> |
| C x M                    | 3                  | 112        | 3,057    | = 0,0313 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> variables significativas

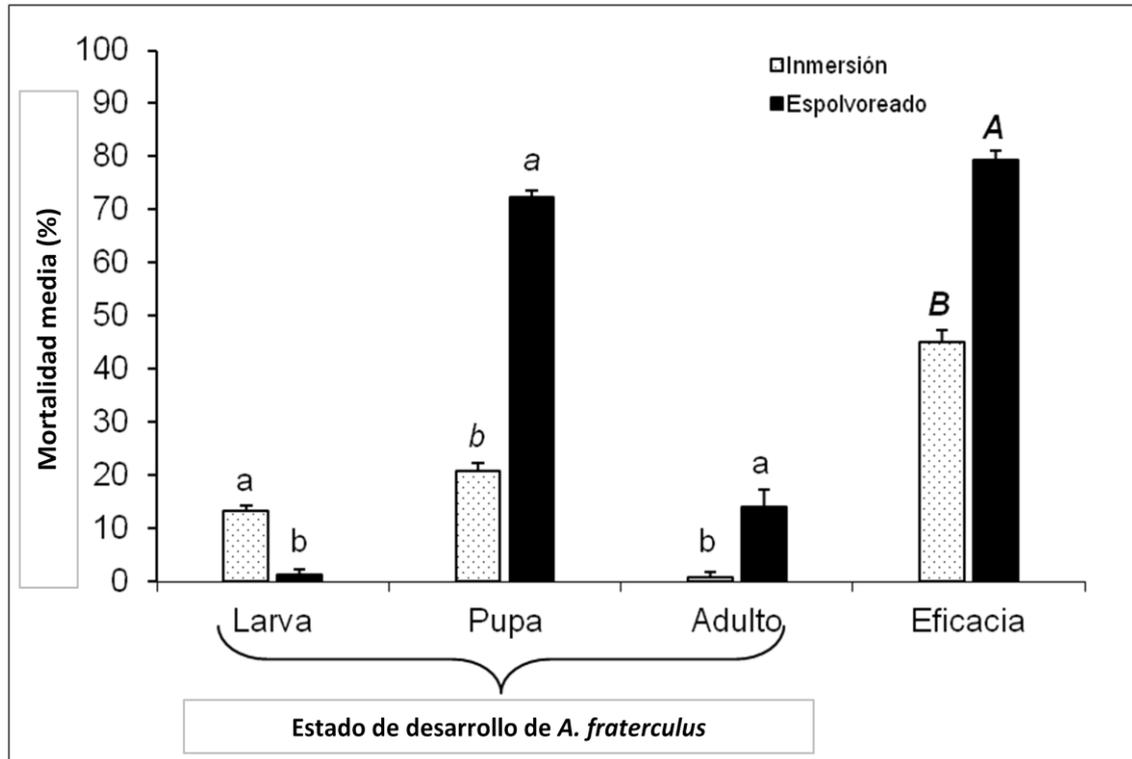


Gráfico 17. Mortalidad de larvas, pupas y adultos de *A. fraterculus* producida por las cuatro cepas de *B. bassiana*, como así también de la eficacia de las cepas, usando los métodos de aplicación por inmersión y espolvoreo. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas, según el Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

La comparación entre las cuatro cepas de *B. bassiana* considerando simultáneamente ambos métodos de infección, mostró el mismo patrón previamente descrito, ya que las cepas CEP 321 y CEP 322 fueron significativamente más eficaces que CEP 323 y CEP 324. La eficacia de CEP 321 y CEP 322 estuvo sustentada por una mortalidad significativamente mayor en pupas (Gráfico 18).

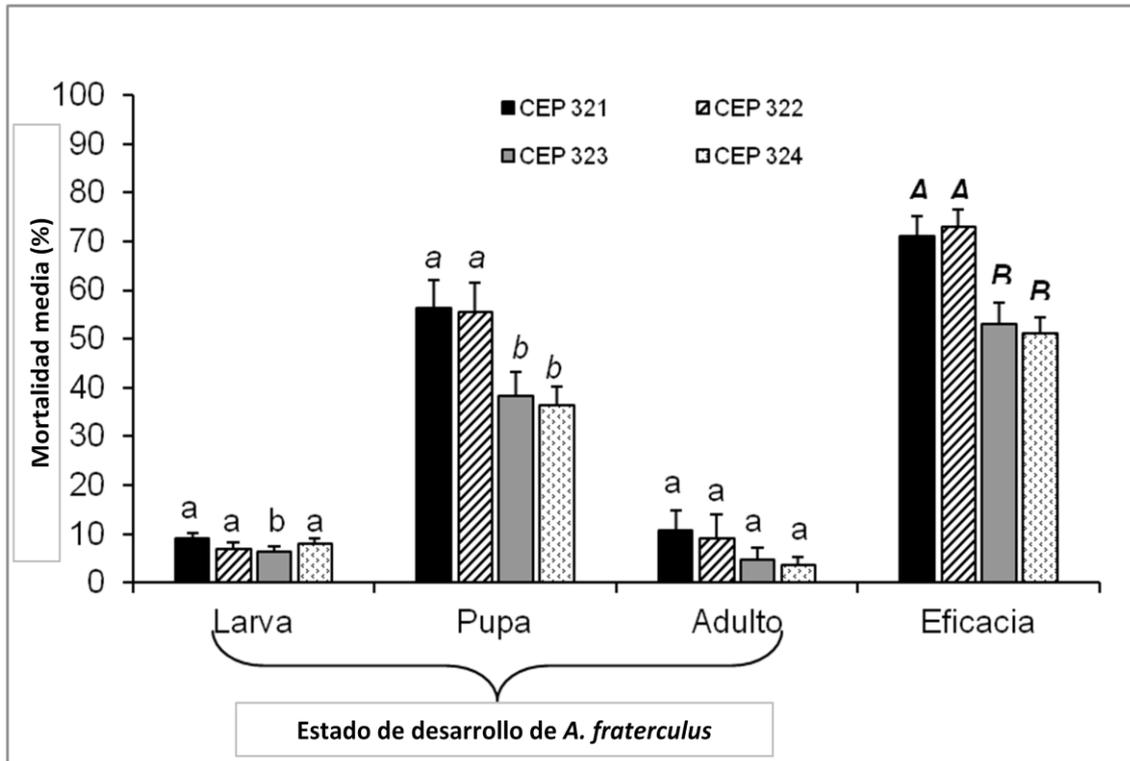


Gráfico 18. Mortalidad de larvas, pupas y adultos de *A. fraterculus* producida por las cuatro cepas de *B. bassiana*, como así también de la eficacia de las cepas, considerando simultáneamente ambos métodos de aplicación (inmersión y espolvoreo). Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas, según el Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

El análisis de la interacción de los factores “cepas” y “métodos de aplicación” mostró que el método de inmersión fue en las cuatro cepas significativamente superior que el método de espolvoreo en función de la mortalidad de larvas de *A. fraterculus* (Gráfico 19).

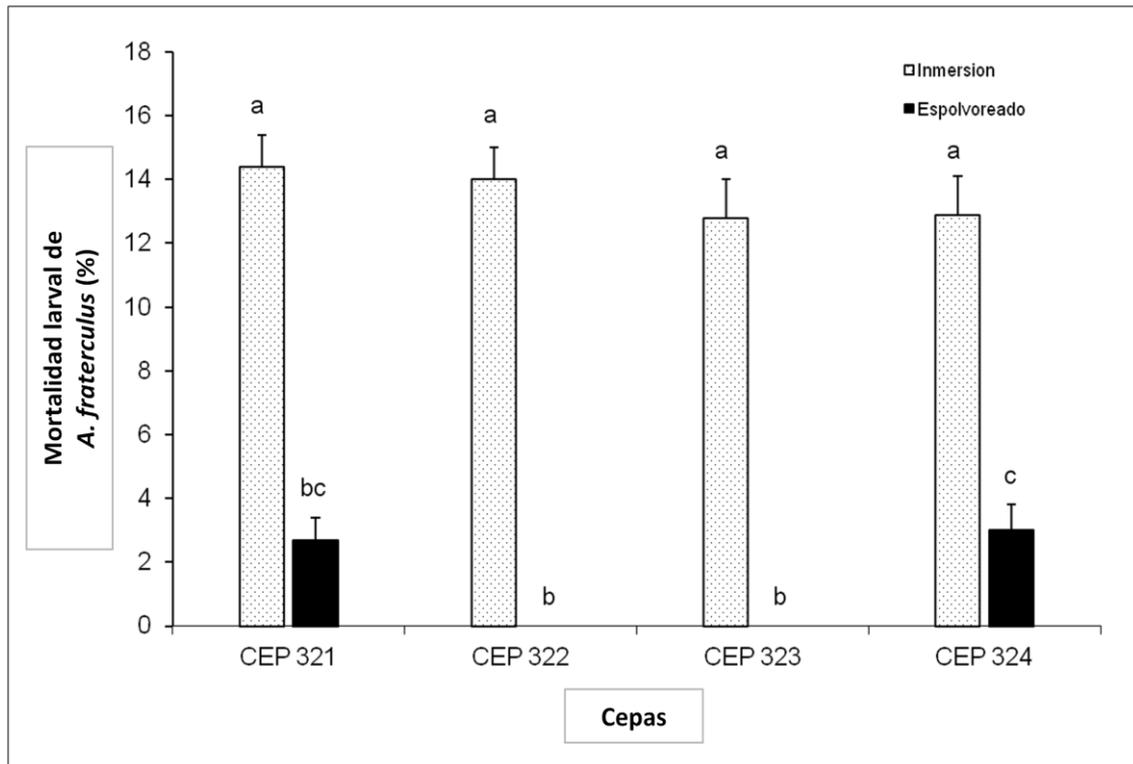


Gráfico 19. Mortalidad de larvas de *A. fraterculus* producida por las cuatro cepas de *B. bassiana* en función de los métodos de aplicación por inmersión y espolvoreo. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas, según el Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

Lo contrario ocurrió cuando se analizó la mortalidad del estado de pupa de *A. fraterculus*. En este caso, el método de espolvoreo fue en las cuatro cepas significativamente superior al de inmersión (Gráfico 20).

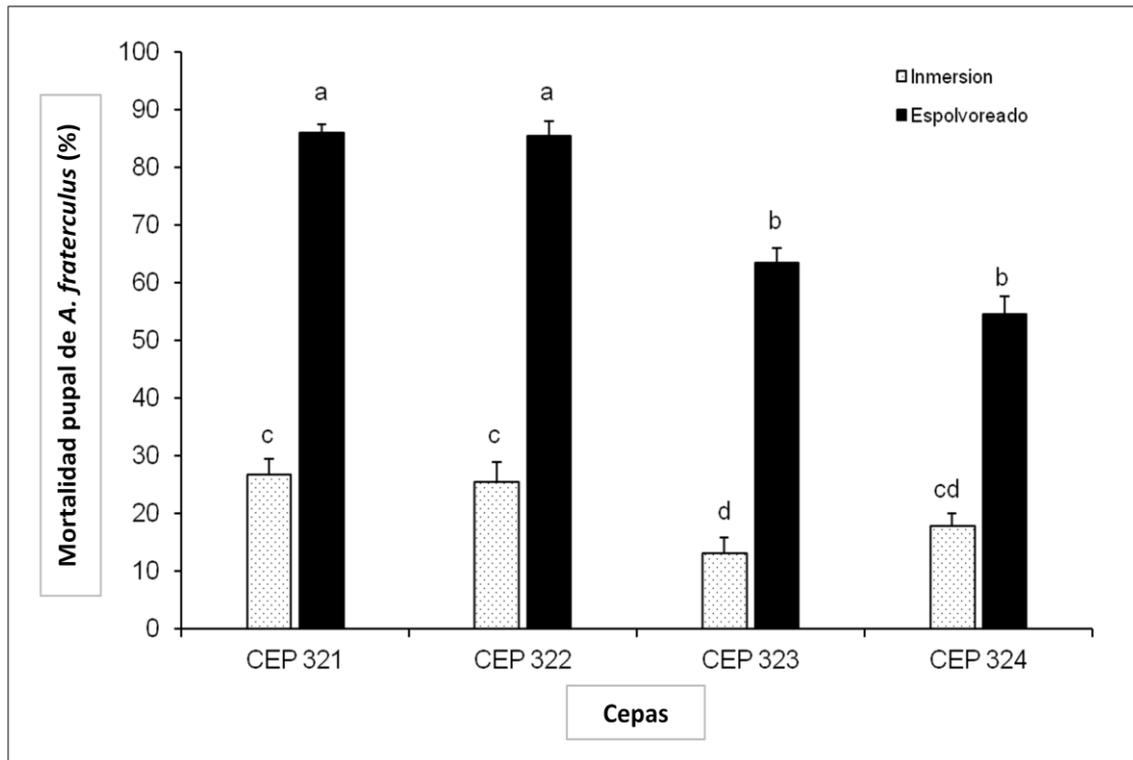


Gráfico 20. Mortalidad de pupas de *A. fraterculus* producida por las cuatro cepas de *B. bassiana* en función de los métodos de aplicación por inmersión y por espolvoreo. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas, según el Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

Con respecto a la eficacia, el método de espolvoreo fue en las cepas CEP 321, CEP 322 y CEP 323 significativamente superior al de inmersión, mientras que los resultados con la CEP 324 no evidenciaron diferencias significativas entre ambos métodos (Gráfico 21).

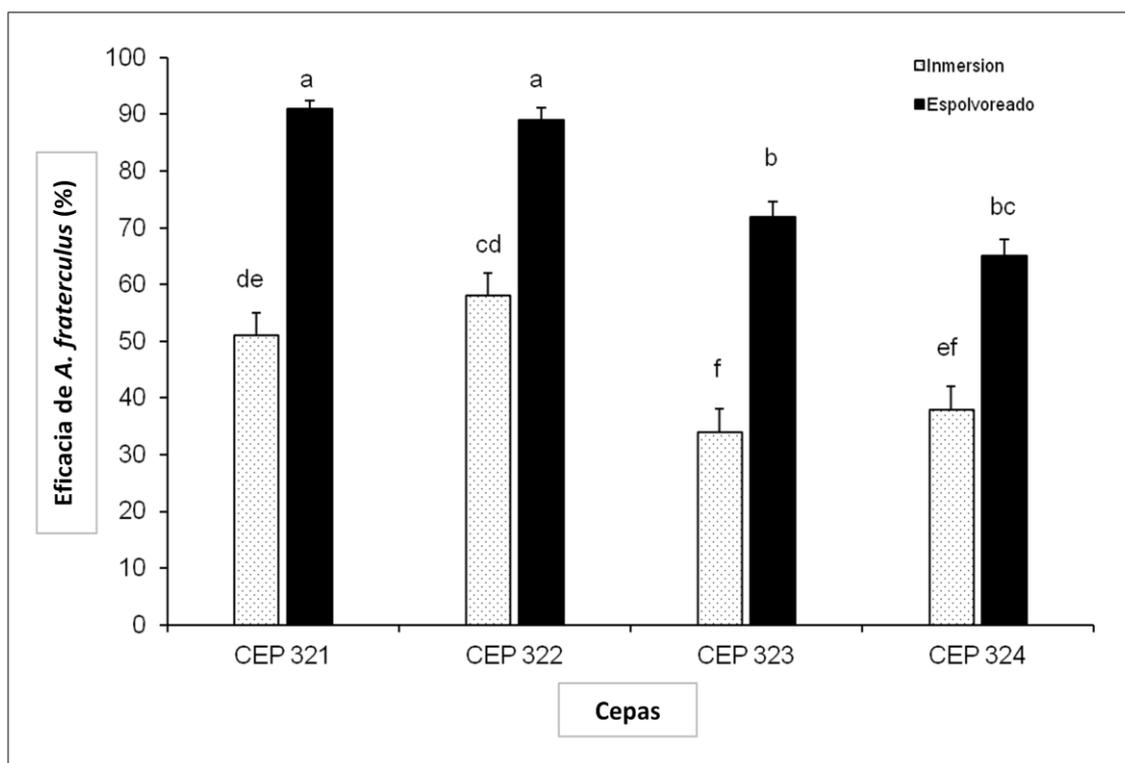


Gráfico 21. Eficacia (% porcentaje de mortalidad de *A. fraterculus*) de las cuatro cepas de *B. bassiana* en función de los métodos de aplicación por inmersión y por espolvoreo. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas, según el Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

#### 4.4. Patogenicidad de hongos entomopatógenos aislados de hospederos no-tefritidos

Si bien los resultados no fueron analizados estadísticamente debido a que no se efectuaron replicas, en los Gráficos 22 y 23 se muestran los porcentajes de mortalidad y eficacia (mortalidad real) de las cepas seleccionadas, sobre adultos de *A. fraterculus*, inoculados por los métodos de inmersión y aspersion de la suspensión de conidios, respectivamente.

En el ensayo por el método de inmersión, se observó un alto porcentaje de mortalidad y eficacia por parte de CEP 148, del 86% y del 87%, respectivamente (Gráfico 22). Mientras que en los adultos inoculados por el método de Aspersion, la mortalidad y eficacia no superaron el 15%, siendo del 14% y 15% y del 4% y 5% para la CEP 189 y CEP 316, respectivamente (Gráfico 23).

En el Gráfico 24 se observa la baja mortalidad y eficacia, ocasionada por las diferentes cepas evaluadas, sobre larvas de *A. fraterculus* con el método de Aspersión de la suspensión de conidios en tierra. Los valores de mortalidad oscilan entre el 12% y 16% y los de eficacia entre 12% y 18%.

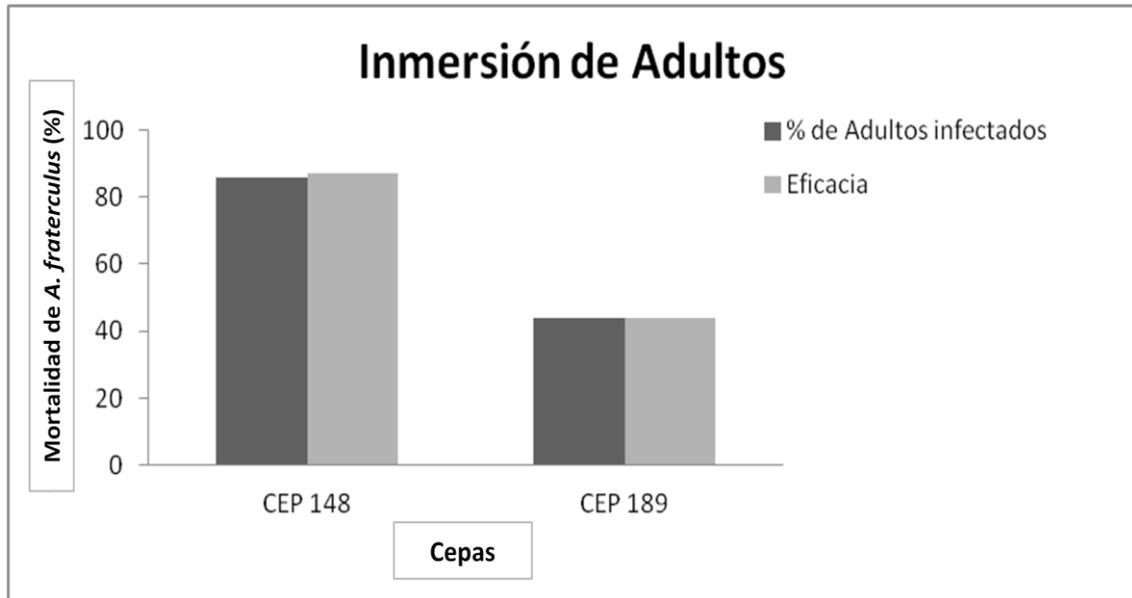


Gráfico 22. Mortalidad y eficacia contra adultos de *A. fraterculus*, por el método de inmersión.

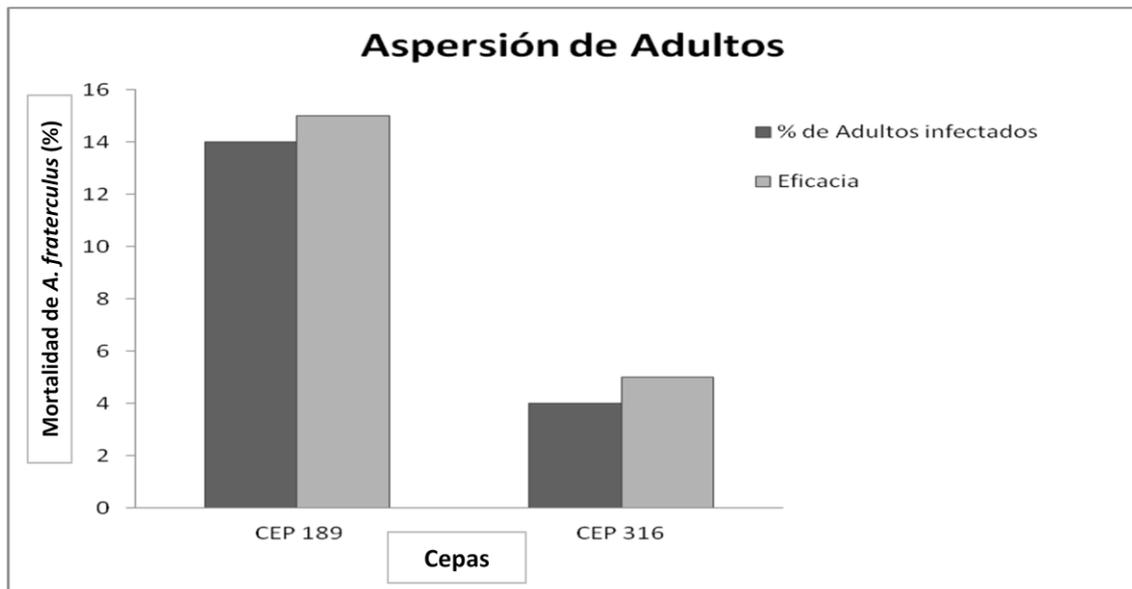


Gráfico 23. Mortalidad y eficacia contra adultos de *A. fraterculus*, por el método de Aspersión.

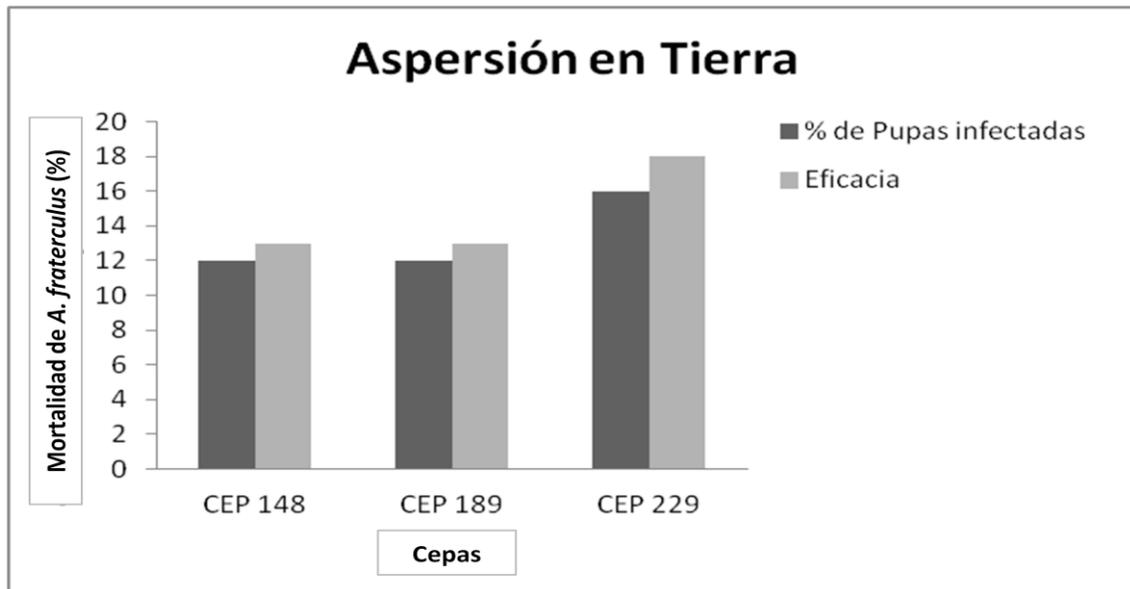


Gráfico 24. Mortalidad y eficacia contra larvas de *A. fraterculus*, por el método de Aspersión en tierra.

#### 4.5. Evaluación del sinergismo entre el parasitoide pupal *Coptera haywardi* y el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* aislado de un hospedero no tefrítido contra larvas de *Ceratitis capitata* en condiciones experimentales de campo

El ANOVA de 2 vías mostró diferencias significativas entre los distintos experimentos realizados para evaluar la eficacia de *B. bassiana* y *C. haywardi* por separado, como así también la interacción entre ambos enemigos naturales en el control de *C. capitata* (Tabla 17). Además, este análisis resaltó la similitud estadística entre las distintas fechas de exposición de *C. capitata* a los agentes de control (factor temporal) y la ausencia de significancia en la interacción de ambos factores (Tabla 17).

Tabla 17. Resultados del ANOVA de dos vías sobre la eficacia de la cepa de hongo entomopatógeno *B. bassiana*, del parasitoide *C. haywardi* y de la interacción de ambos factores para causar mortalidad a la especie plaga *C. capitata* en función de las distintas fechas de exposición del tefrítico a los enemigos naturales.

| FUENTE DE VARIACION      | VARIABLE RESPUESTA |               |                                |                       |
|--------------------------|--------------------|---------------|--------------------------------|-----------------------|
|                          | gl                 | gl<br>(Error) | Eficacia<br>(%mortalidad real) |                       |
|                          |                    |               | F                              | P                     |
| Experimentos (E)         | 2                  | 36            | 92,834                         | < 0,0001 <sup>a</sup> |
| Fechas de exposición (T) | 2                  | 36            | 0,89                           | = 0,4193              |
| E x T                    | 4                  | 36            | 0,704                          | = 0,594               |

<sup>a</sup> variable significativa

La acción conjunta de *B. bassiana* y de *C. haywardi* produjo un aumento de la mortalidad en *C. capitata* de 2,1 y 1,4 veces con respecto a la acción individual del hongo entomopatógeno y del parasitoide, respectivamente (Gráfico 25). La eficacia de esta acción conjunta llevó a un 95% de mortalidad de la plaga. Los tratamientos control registraron una mortalidad inferior al 5%.

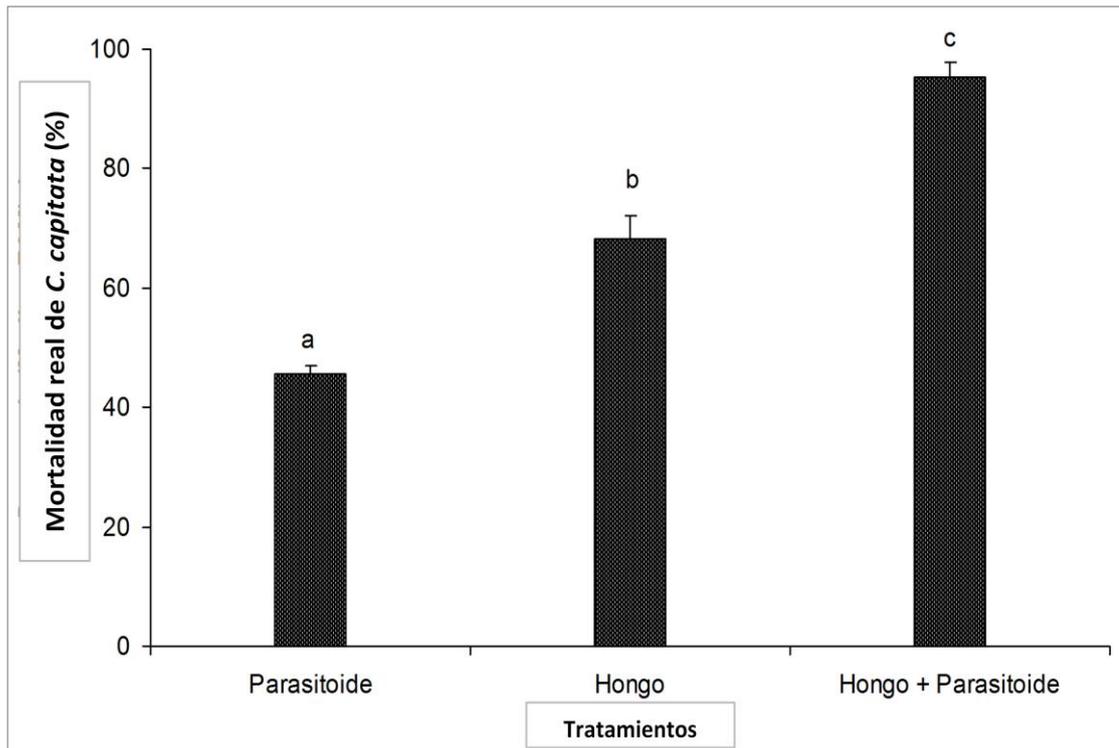


Gráfico 25. Eficacia (= mortalidad real de *C. capitata*) del hongo *B. bassiana* y del parasitoide *C. haywardi*, actuando individualmente y en combinación, en el control de la plaga. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas, según el Test de Tukey,  $P = 0,05$ .

El porcentaje de mortalidad total de *C. capitata* (sumatoria de larvas, pupas y adultos) ocasionado por *B. bassiana* fue significativamente similar entre los dos tratamientos que involucraron la presencia de éste enemigo natural (Gráfico 26). La mortalidad de la plaga por acción del hongo varió entre 62 y 66%. De este total, el 84-91% de la mortalidad de la plaga fue causado en el estado de adulto (Gráfico 27).

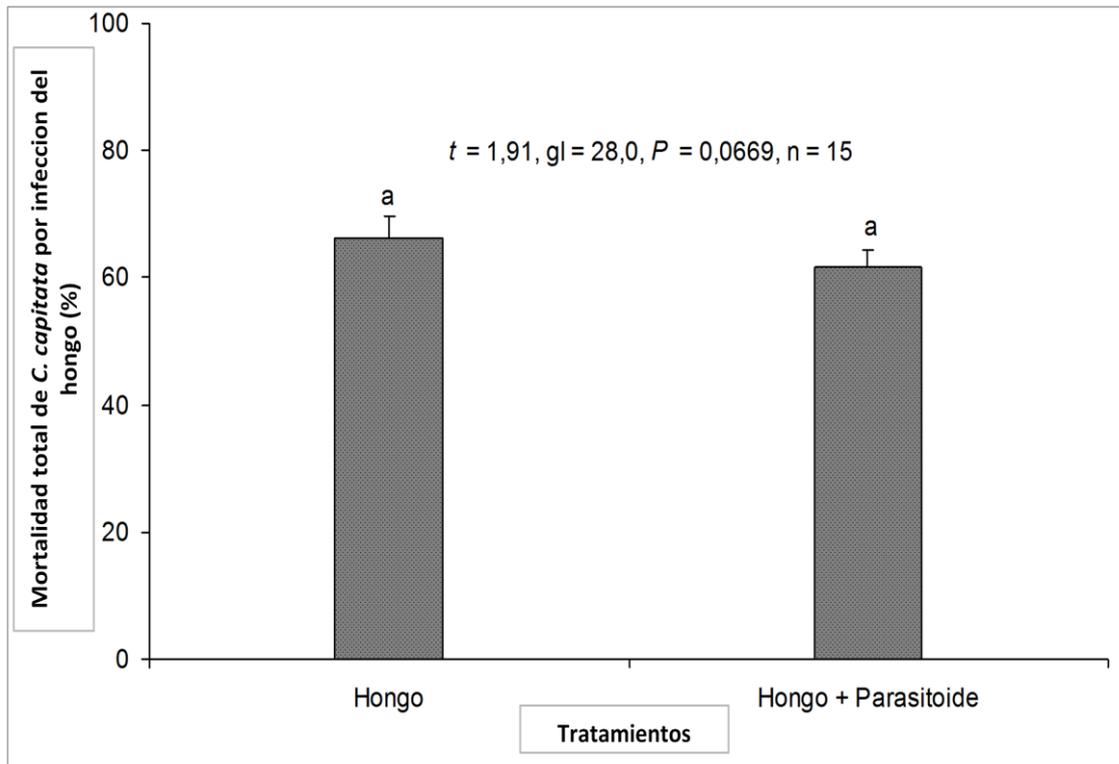


Gráfico 26. Mortalidad total en *C. capitata* (larva, pupa y adulto) entre los tratamientos “Hongo solo” y “Parasitoide en combinación con el hongo”. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas, según la prueba *t*-student,  $P = 0,05$

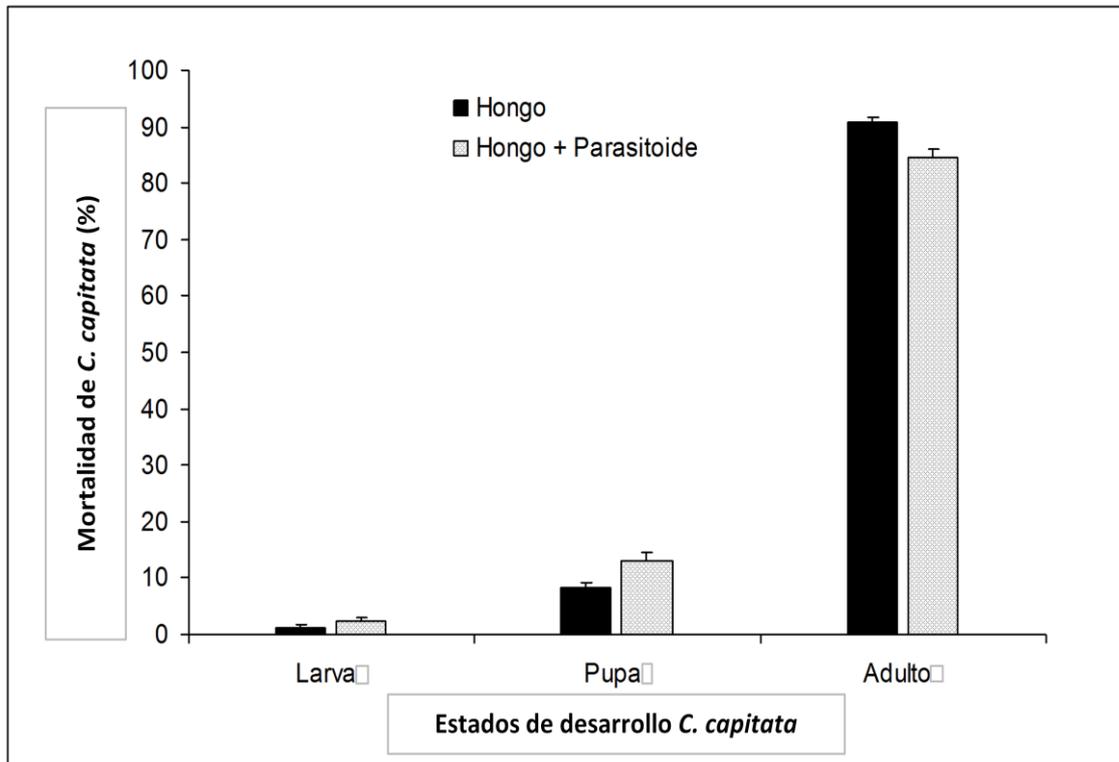


Gráfico 27. Mortalidad de larvas, pupas y adultos de *C. capitata* en relación a la mortalidad total del tefrítido por acción *B. bassiana*.

La mortalidad de *C. capitata* por acción del parasitoide, evaluada como el porcentaje de parasitismo efectivo, fue significativamente diferente entre los dos tratamientos que involucraron la presencia de *C. haywardi*. El parasitoide causó una mortalidad significativa 1,4 veces mayor cuando estuvo solo que en asociación con el hongo (Gráfico 28). La mortalidad de la plaga por acción de *C. haywardi* varió entre 23 y 32%. En el tratamiento que combinó ambos tipos de enemigos naturales, el hongo patógeno ocasionó una mortalidad del  $15,6 \pm 1,8\%$  sobre el total de individuos de *C. haywardi* recuperados. De esta mortalidad, el 75% fueron adultos del parasitoide y el restante 25% fueron pupas.

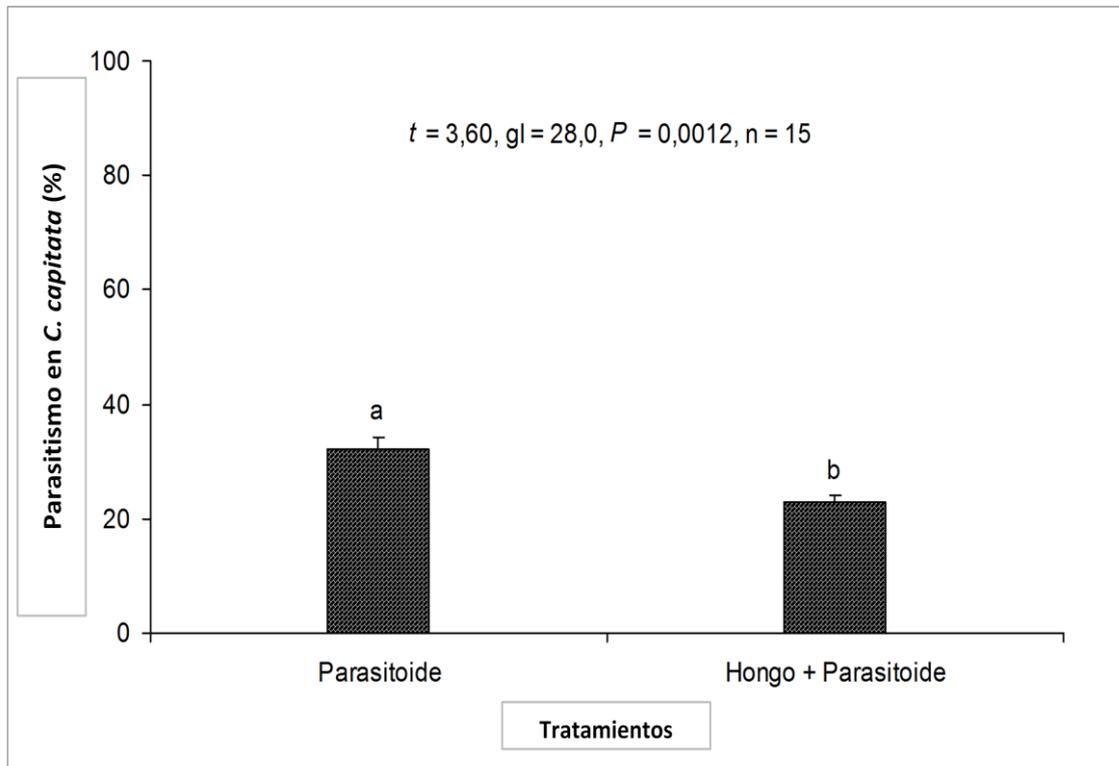


Gráfico 28. Parasitismo de *C. capitata*. Diferencia entre “Parasitoide solo” y “Parasitoide en combinación con el hongo”. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos, según la prueba *t*-student,  $P = 0,05$ .

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Prospección de hongos entomopatógenos

La prospección en larvas y pupas de *A. fraterculus* y *C. capitata* permitió realizar el aislamiento de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* y cepas de los géneros *Aspergillus* Link, *Penicillium* Link, *Mucor* Micheli y *Fusarium* Link. Actualmente, los registros de hongos patógenos aislados de “moscas de la fruta” son *I. fumosorosea* y *A. ochraceus* Wilhelm provenientes de *Anastrepha* sp. y de *C. capitata*, respectivamente (Castillo *et. al.*, 2000) y *M. hiemalis* Wehmer, *P. aurantiogriseum* Dierckx y *P. chrysogenum* Thom aislados de pupas de *B. oleae* (Konstantopoulou y Mazomenos, 2005). *Isaria fumosorosea* fue evaluada exitosamente contra *C. capitata* (Castillo *et. al.*, 2000; Beris, *et. al.*, 2013). Mientras que *A. ochraceus* produce Acrotoxina A y por ello sería inadecuado su uso como agentes de control biológico, ya que existen pruebas suficientes de la carcinogenicidad de esta micotoxina (WHO-IARC, 1993) sumado al hecho de que algunos países fijaron límites reglamentarios para micotoxinas (FAO, 2003). Los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* han sido reportados como productores de toxinas nocivas para la salud humana (Peraica *et al.*, 1999) y de los animales (D'Mello y MacDonald, 1997).

Entre los hongos entomopatógenos mas estudiados para el control de “moscas de la fruta” a nivel mundial se encuentran *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. La primera especie fue evaluada bajo condiciones de laboratorio (Toledo *et al.*, 2007; Sookar *et al.*, 2008; Ortu *et al.*, 2009; Hernández Días-Ordaz *et al.*, 2010; Beris *et al.*, 2013) y en campo (Toledo *et al.*, 2007; Sabbour *et al.*, 2012) contra *A. ludens* (Loew), *A. fraterculus*, *A. obliqua* (Macquart), *C. capitata*, *Bactrocera oleae* (Rossi), *B. cucurbitae* (Coquillett) y *B. zonata* (Saunders). *Metarhizium anisopliae* fue también evaluado para el control de *A. ludens*, *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *Bactrocera* spp, *C. capitata*, *C. cosyra* (Walker) y *C. fasciventris* (Bezzi) (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2000; Rodrigues Destéfano *et al.*, 2005; Toledo *et al.*, 2006; Hernández Días-Ordaz *et al.*, 2010; Mar y Lumyong, 2012; Dimbi *et al.*,

2013). Esta última especie de hongo entomopatógeno no fue aislada en el presente trabajo de tesis.

De los géneros registrados en el presente trabajo de tesis, *Beauveria* fue el más evaluado en diferentes especies de “moscas de la fruta” según la bibliografía consultada, representando un 57%. De este total, la especie *B. bassiana* fue evaluada en el 96% de los artículos consultados, mientras que las especies *B. pseudobassiana* y *B. varroae* se estudiaron solo en el 4% de los artículos. Los géneros *Mucor* y *Aspergillus* fueron evaluados en el 2% de las publicaciones preliminares. Si bien *M. anisopliae* no se registró en el presente estudio esta especie fue la más estudiada para el control de “moscas de la fruta” en la bibliografía consultada.

## 5.2. Patogenicidad

### 5.2.1. Patogenicidad de cepas de *B. bassiana* aisladas de larvas de *A. fraterculus*

#### 5.2.1.1. Patogenicidad sobre los estados inmaduros (larval y pupal) de *A. fraterculus* y *C. capitata*

La patogenicidad de los hongos entomopatógenos ha sido reportada para larvas de las siguientes especies de “moscas de la fruta”: *A. fraterculus* (Rodrigues Destéfano *et al.*, 2005; Bechara *et al.*, 2011), *A. ludens* (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2000; de la Rosa *et al.*, 2002; Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2012), *C. capitata* (Ekesi *et al.*, 2002; Ekesi *et al.*, 2005; Quesada-Moraga *et al.*, 2006, 2008; Mochi *et al.*, 2006; Boudjelida y Soltani, 2011; Garrido-Jurado *et al.*, 2011a,b; Imoulan y Elmeziane, 2013), *C. rosa* (Ekesi *et al.*, 2002), *B. dorsalis* (Aemprapa, 2007), *R. indifferens* (Cossentine *et al.*, 2010, 2011) y *R. cerasi* (Daniel y Wyss, 2009). En cuanto a estudios de patogenicidad realizados sobre pupas de “moscas de la fruta”, la especie de tefrítido más estudiada fue *C. capitata* (Ekesi *et al.*, 2002, 2003; Mochi *et al.*, 2006; Quesada-Moraga *et al.*, 2006; Imoulan *et al.*, 2011; Beris *et al.*, 2013; Imoulan y Elmeziane, 2013). Además de *C. capitata*, se evaluaron hongos entomopatógenos en pupas de *A. ludens* (de la Rosa *et al.*, 2002; Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2012); *A. fraterculus* (Rodrigues Destéfano *et al.*, 2005), *C. rosa* (Ekesi *et al.*, 2002), *R.*

*indifferens* (Yee y Lacey, 2005; Cossentine *et al.*, 2010), *R. cerasi* (Daniel y Wyss, 2009) y *Bactrocera* spp. (Mar y Lumyong, 2012).

Una de las especies de hongos entomopatógenos más virulenta evaluadas sobre *A. fraterculus* y *C. capitata* es *B. bassiana*, según datos aportados por Castillo *et al.* (2000); Ekesi *et al.* (2007); Daniel y Wyss (2009); Garrido-Jurado *et al.* (2011a,b); Imoulan y Elmeziane (2013). En el presente estudio, mediante la evaluación de las cuatro cepas de *B. bassiana*, se obtuvo que la suma de las mortalidades de larvas y pupas de *A. fraterculus* y *C. capitata* fue superior al 55% por el método de espolvoreo, mientras que por el método de inmersión los valores no superaron el 27%. Contrariamente a los valores obtenidos en el presente estudio mediante el método de inmersión, Quesada-Moraga *et al.* (2006), Imoulan *et al.* (2011) e Imoulan y Elmeziane (2013) reportaron tasas de mortalidad en larvas-pupas de *C. capitata* por acción de *B. bassiana* de 14 a 96%, 86% y de 63 a 92%, respectivamente. Mientras que Beris *et al.* (2013) obtuvieron mortalidades similares a los registrados en este trabajo de tesis. Otros autores como De la Rosa *et al.* (2002) registraron tasas de mortalidad en larvas-pupas de *A. ludens* menores al 10%, mediante la inmersión de las mismas en una suspensión de  $1-1,6 \times 10^8$  conidios/ml de *B. bassiana*; mientras que Gandarilla-Pacheco *et al.* (2012) obtuvieron tasas de mortalidad en larvas de *A. ludens* del 57% y en pupas del 62%, evaluando a *I. fumosorosea* mediante una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/ml. De manera coincidente a los datos que se presentan en este trabajo, Rodrigues Destéfano *et al.* (2005) registraron mortalidades en larvas-pupas de *A. fraterculus* que variaron entre 67 a 70% y de 95 a 97% ante concentraciones altas de inóculo ( $2.52 \times 10^{10}$  conidios/gr de suelo), aunque evaluando el hongo *M. anisopliae*. Otros autores como Espín *et al.* (1989) aplicaron directamente *M. anisopliae* a pupas de *C. capitata* registrando una infección del 66%.

En el presente estudio, el método de espolvoreo de conidios resultó más efectivo que el método de inmersión al momento de evaluar la mortalidad de larvas y pupas de *A. fraterculus* y *C. capitata*. Una posible causa de ello sería que los conidios al estar en un medio líquido escurren del cuerpo del insecto

con mayor facilidad, reduciendo su tiempo de contacto con las larvas y pupas del insecto. Esto afectaría la primera etapa del mecanismo de acción de los hongos, la cual consiste en la adhesión de los conidios (adsorción, consolidación, germinación y desarrollo de la espora). Por consiguiente, la infección del insecto no se llevaría a cabo exitosamente. En el método de espolvoreo los conidios tendrían la posibilidad de permanecer más tiempo en el cuerpo del insecto, hasta completar el proceso de adhesión. Samson *et al.* (1988) y Shapiro *et al.* (2005) expusieron que el resultado de la germinación y la penetración no depende necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de duración del proceso la germinación, la agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedador. No obstante, Kaaya (1989) reportó que la aplicación de esporas secas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* no produjo mortalidad en las larvas y pupas de la mosca tsetse, *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae), mientras que Kaaya y Okech (1990) obtuvieron altos niveles de mortalidad en adultos de mosca tsetse recientemente emergidos de las pupas que habían sido expuesto a *M. anisopliae*. Las diferencias con nuestros resultados podrían deberse al tipo de huésped estudiado. Por ejemplo, Hajek y St. Leger (1994) demostraron que la baja patogenicidad de hongos entomopatógenos contra muchas especies de insectos se debe a la naturaleza de la cutícula, en términos de su densidad, espesor y el grado de esclerotización, entre otros factores. El grado de esclerotización de la cutícula de los insectos, el método de aplicación del hongo, la etapa de la vida involucrados, la muda, y la bioquímica de la superficie del insecto son factores que podrían afectar a la eficacia de los hongos patógenos para controlar insectos plagas (Ferron 1981).

#### **5.2.1.2. Patogenicidad de *B. bassiana* sobre adultos de *A. fraterculus* y *C. capitata***

Se realizaron diversos estudios de patogenicidad de hongos sobre adultos de “moscas de la fruta” (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2000; Ekesi *et al.*, 2007; Sookar *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2009; Daniel y Wyss, 2009; Hernández Díaz- Ordaz *et al.*, 2010; Osorio-Fajardo y Canal 2011; Sabbour *et al.*, 2012;

Beris, *et al.*, 2013). La especie más estudiada fue *C. capitata*, tanto para su control con *B. bassiana* (Porras y Lecuona, 2008; Muñoz *et al.*, 2009; Sabbour *et al.*, 2012; Imoulan y Elmeziane, 2013) como con *M. anisopliae* (Mochi, *et al.*, 2006; Quesada-Moraga *et al.*, 2008; Dimbi, *et al.*, 2009, 2013). En el presente estudio, al realizar la inoculación de larvas también se observó el efecto de *B. bassiana* en la emergencia de los adultos y el control total efectuado sobre ambas especies de “moscas de la fruta”. Las mortalidades registradas fueron menores al 1% y 22%, mediante la aplicación del inoculo por inmersión y espolvoreo, respectivamente. Contrario a estos resultados Imoulan y Elmeziane (2013) y Beris, *et al.* (2013) registraron altos porcentajes de mortalidad en adultos de *C. capitata* cuando sus larvas fueron tratadas con *B. bassiana* por inmersión y colocadas en suelo para su pupación. Sin embargo, el control total efectuado sobre la plaga fue alto, tanto para el presente trabajo de tesis como la registrada por los autores anteriormente mencionados. Ali *et al.* (2009) consideraron a *B. bassiana* como un efectivo controlador de adultos de *C. capitata* al inocular pupas en suelo. Daniel y Wyss (2009) observaron que la emergencia de adultos de *R. cerasi* no se vio afectado cuando las larvas fueron sumergidas en una suspensión de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. farinosa* e *I. fumosorosea*, y que ninguno de los adultos muertos presento signos de micosis. Otros autores, como Yee y Lacey (2005) también observaron que la emergencia de adultos de *R. indifferens* no fue afectada cuando las esporas de *M. anisopliae* fueron mezcladas en el suelo o aplicadas superficialmente, pero si produjo una mortalidad de hasta el 68% en los adultos emergidos. Los datos registrados por Rodrigues Destéfano *et al.* (2005), mostraron que *M. anisopliae* redujo la emergencia de adultos de *A. fraterculus* en un 84% y produjo un control total del 95% de la plaga, cuando los conidios fueron mezclados en suelo.

Contrariamente a la metodología utilizada en este trabajo de tesis, en los trabajos expuestos anteriormente se observa que las larvas inoculadas por inmersión son colocadas en suelo o que la inoculación se hace directamente sobre éste. Por lo tanto la persistencia de conidios en el suelo permitiría no solo la infección de larvas y pupas sino también de los adultos emergentes,

como fue observado por Rodrigues Destéfano *et al.* (2005). También se deberían tener en cuenta los factores que pueden afectar la eficacia de los hongos patógenos (Ferron 1981), como se mencionó en el apartado anterior.

## **5.2.2. Patogenicidad de cepas aisladas de hospederos no-tefritidos sobre *A. fraterculus***

### **5.2.2.1. Patogenicidad de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* sobre adultos de *A. fraterculus***

Los hongos más estudiados para el control de adultos de “moscas de la fruta” son *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Sookar *et al.*, 2008; Daniel y Wyss, 2009; Mahmoud, 2009a,b; Hernández Díaz- Ordaz *et al.*, 2010; Osorio-Fajardo y Canal, 2011). Otras especies evaluadas fueron *I. fumosorosea* (Sookar *et al.*, 2008), *I. farinosa* (Daniel y Wyss, 2009), *L. muscarium* (Mahmoud, 2009a) *L. lecanii* (Mahmoud, 2009b). En el presente estudio la inoculación de adultos por inmersión y aspersion causó mortalidades de 44% y 86% y menores a 12%, respectivamente. En los trabajos publicados consultados, independientemente del método de aplicación y de la especie de hongo entomopatógeno empleada para el control de adultos de distintas especies de “moscas de la fruta”, la mortalidad producida sobre esta plaga osciló entre el 20 y 100%. Este rango de efectividad es superior al obtenido en el presente estudio mediante el uso de la cepa de *B. bassiana* aislada de larvas de *A. fraterculus*. Por ejemplo, Muñoz *et al.* (2009) y Ali *et al.* (2008), registraron niveles de mortalidad entre el 20 y 99% y del 100% para adultos de *C. capitata*, respectivamente, cuando fueron inoculados mediante el método de inmersión con *B. bassiana*. Ali *et al.* (2008), también evaluaron mediante inmersión la mortalidad de adultos de *C. capitata* por acción de *I. fumosorosea*, obteniendo valores del 82%. De la Rosa *et al.* (2002) mediante la aspersion de *M. anisopliae* y *B. bassiana* para el control de *A. ludens*, informaron un rango de mortalidad entre 82% y 100%. Boudjelida y Soltani (2011) reportaron mortalidades mayores al 76% para *C. capitata* cuando fueron tratadas con *M. anisopliae* (aspersion). Otros autores como Castillo *et al.* (2000) y Quesada-Moraga *et al.* (2006) registraron tasas de

mortalidad en *C. capitata* del 100% y del 30 al 100%, cuando fueron inoculados con *M. anisopliae* y *B. bassiana* (aplicación tópica), respectivamente. Toledo *et al.* (2006) realizaron la aplicación de conidios secos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en *C. capitata* y *A. ludens*, reportando mortalidades superiores al 75%. Porras y Lecuona (2008), obtuvieron valores de mortalidad mayores al 75% para *C. capitata* al usar a *B. bassiana* mediante la ingestión junto con la dieta. Mahmoud (2009b), usando un método similar a Porras y Lecuona (2008), reportó que *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *L. lecanii* produjeron una mortalidad superior al 80% sobre *B. oleae*.

#### **5.2.2.2. Patogenicidad de cepas de *B. bassiana* sobre larvas de *A. fraterculus***

Al evaluar la mortalidad de larvas y pupas de *A. fraterculus* por medio de cepas aisladas de hospederos no tefritidos se obtuvieron valores bajos, los cuales variaron entre 12 y 16%. Contrario a los resultados obtenidos en el presente trabajo los porcentajes de mortalidad registrados en la bibliografía consultada fluctuaron entre 20 y 80%, cuando la inoculación del patógeno fue realizada en suelo. Por ejemplo, Cossentine *et al.* (2010) obtuvieron una mortalidad mayor al 80% en *R. indifferens* cuando fue tratada con *M. brunneum*; Gandarilla-Pacheco *et al.* (2012) registraron mortalidades del 20% al 57% en *A. ludens* al ser tratadas con *I. fumosorosea*; Lozano-Tovar *et al.* (2013) mediante la aplicación de *B. bassiana*, *B. pseudobassiana* y *M. brunneum* obtuvieron hasta un 45 % de mortalidad en *C. capitata*. Es importante remarcar que los valores de mortalidad del hospedador registrados por los autores anteriormente citados, se asemejan más a los porcentajes de mortalidad obtenidos en el presente trabajo con las cuatro cepas de *B. bassiana* aisladas de larvas de *A. fraterculus* mediante el espolvoreo de conidios. Con este método se obtuvieron porcentajes de mortalidad de 55% a 86% y de 70% a 96% en *A. fraterculus* y *C. capitata*, respectivamente. A pesar de que *B. bassiana* es una especie con un amplio rango de hospederos (Goettel *et al.*, 1990), el hecho de haber sido aislada directamente de la plaga a controlar (*A. fraterculus*), le proporcionaría un mayor grado de especificidad

hacia ella. Estos resultados permiten formular dos predicciones: (1) el empleo de las cepas nativas de *B. bassiana* aisladas en el presente estudio permitiría alcanzar un control más efectivo de *A. fraterculus* dentro de un programa de manejo integrado de la plaga; (2) el método de inoculación del insecto por el hongo usado para el control de la plaga, influiría en los valores de mortalidad de ésta.

### **5.2.3. Sinergismo entre *Coptera haywardi* y *Beauveria bassiana* contra larvas de *Ceratitis capitata* en condiciones experimentales de campo**

Los resultados de este estudio mostraron una eficacia del 95% cuando se combinó la acción de los dos enemigos naturales para controlar a *C. capitata*. No obstante, el efecto del *C. haywardi* sobre la mortalidad de la plaga disminuyó cuando el parasitoide fue utilizado junto con *B. bassiana*. La diferencia en el porcentaje de parasitismo entre los dos tratamientos que involucraron a *C. haywardi* probablemente fue ocasionada por un efecto negativo del hongo sobre el parasitoide. Aproximadamente el 15% de pupas de *C. capitata* parasitadas fueron a su vez infectadas por el hongo en el tratamiento donde se combinaron ambos enemigos naturales. Esta situación produjo la muerte del parasitoide antes de su emergencia como adulto. A pesar de la mortalidad de *C. haywardi* causada por *B. bassiana*, ésta sería despreciable ante una eficacia del 95% por acción conjunta de ambos enemigos naturales. Contrario a la información presentada en el presente estudio, Castillo *et al.* (2009) señalaron el efecto negativo del uso conjunto de una cepa de *B. bassiana* y del parasitoide *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae), ya que el hongo causó la mortalidad del 100% de los estados inmaduros del parasitoide. Opuesto a los datos aportados por Castillo *et al.* (2009), y más afines con los resultados de la presente tesis, Folegatti y Alves (1987) mostraron que *M. anisopliae* no causó infecciones en *Cotesia (Apanteles) flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) cuando se emplearon ambos enemigos naturales en el control de *Diatraea saccharalis* Fab. (Lepidoptera: Crambidae); Ekesi *et al.* (2005) no observaron mortalidad en *Psytalia concolor* (Szépliget) (Hymenoptera: Braconidae) y *P. cosyrae*

(Wilkinson) ocasionada por *M. anisopliae* cuando fueron evaluados para el control de *C. capitata* y *C. cosyrae*; Stolz (1996) no registró efectos negativos sobre la mortalidad y la reproducción del parasitoide *Apoanagyrus lopezi* De Santis (Hymenoptera: Encyrtidae), cuando plantas de yuca fueron tratadas con *M. anisopliae* var. *acridum*. La discrepancia en los resultados obtenidos por Castillo *et al.* (2009) y el presente estudio podría deberse al orden de ataque utilizado y el tiempo fisiológico que transcurre entre el ataque de los diferentes enemigos naturales. Esto tiene profundas consecuencias para la interacción y pueden determinar su resultado (Furlong y Pell, 2005), ya que los hongos patógenos tienen un tiempo de desarrollo, generalmente más corto que el de los parasitoides (Brooks, 1993). Una posible explicación a la baja mortalidad producida por *B. bassiana* sobre larvas y pupas de *C. haywardi* se debería a la no existencia de competencia por el mismo recurso, ya que un bajo porcentaje de pupas de *C. capitata* fueron susceptibles a las infecciones fúngicas.

El alto porcentaje de mortalidad registrado en adultos de *C. capitata*, podría deberse a la permanencia en el suelo de pupas muertas y esporuladas, las cuales serían una fuente de inóculo para la infección de los adultos emergentes. Este hecho sería una importante ventaja para el control de insectos plagas como las “moscas de la fruta”, ya que los cadáveres facilitarían la persistencia de los patógenos en el suelo. Además, esta situación garantiza un umbral de inóculo y contribuye a su diseminación en el medio ambiente por medio de la lluvia, el viento, los insectos o por transmisión horizontal (Dowd y Vega, 2003; Meyling *et al.*, 2006; Quesada-Moraga *et al.*, 2006; Toledo *et al.*, 2007).

## 6. CONCLUSIONES

- \* Se obtuvieron 59 aislamientos fúngicos a partir de los estados inmaduros de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) y *Ceratitis capitata* (Wied.). Cuatro correspondieron al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., que fueron aislados a partir de larvas de *A. fraterculus*. Los demás aislamientos corresponden a los géneros *Aspergillus* Link, *Penicillium* Link, *Mucor Micheli* y *Fusarium* Link.
- \* Los aislamientos nativos de *B. bassiana* fueron patogénicos para *A. fraterculus*. El estado pupal fue más susceptible que el larval y adulto, cuando fueron inoculados mediante el método de inmersión.
- \* Los aislamientos nativos de *B. bassiana* fueron patogénicos para *A. fraterculus* y *C. capitata*. Para ambas especies de tefritidos el estado pupal fue el más susceptible, seguido por de adulto y el larval, cuando fueron inoculados mediante el método de espolvoreo.
- \* Cuando se compararon los dos métodos de aplicación, los aislamientos nativos de *B. bassiana* fueron más efectivos contra larvas y pupas de *A. fraterculus*, al ser aplicados mediante el método de espolvoreo. La eficacia total del patógeno en el control de la plaga fue superior aplicando el mismo método de inoculación.
- \* Las cepas *B. bassiana* e *Isaria fumosorosea* (Wize) aisladas de hospederos no tefritidos, evaluadas sobre larvas, pupas y adultos de *A. fraterculus* mostraron una baja patogenicidad, con excepción de los adultos tratados por el método de inmersión.

- \* *Beauveria bassiana* y *Coptera haywardi* Loíacono ejercieron un efectivo control de *C. capitata*, cuando fueron empleados en conjunto. *Coptera haywardi* ejerció un mayor control sobre la plaga cuando fue evaluado en forma individual, mientras que el control ejercido por *B. bassiana* fue similar en los dos tratamientos donde fue empleado. El estado de desarrollo más susceptible a *B. bassiana* fue el de adulto, en el seguimiento post-inoculatorio.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✧ Ampliar el área de prospección de hongos asociados a “moscas de la fruta” a la región del NOA.
  
- ✧ Continuar con la evaluación de las interacciones entre hongos y parasitoides nativos y exóticos. Con un enfoque especial en el efecto causado por el hongo a los parasitoides nativos.
  
- ✧ Hacer evaluaciones en adultos de *A. fraterculus* y *C. capitata*, tanto en condiciones de laboratorio como en campo con los aislamientos nativos de *B. bassiana*.
  
- ✧ Realizar evaluaciones a campo de los aislamientos nativos en cultivos con manejo convencional y así poder evaluar la interacción existente entre hongos e insecticidas.
  
- ✧ Realizar evaluaciones a campo, en cultivos con manejo orgánico, de la interacción entre parasitoides nativos y aislamientos nativos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott WS. 1925. A Method for Computing Effectiveness of an insecticide. *Jour. of Entomol.* 18:265-267.
- Addicot JF, JM Aho, MF Antolin, DK Padilla, JS Richardson, DA Saluk. 1987. Ecological neighbourhoods: scaling enviromental patterns. *Oikos* 49: 340-346.
- Aemprapa S. 2007. Entomopathogenic fungi screening against fruit fly in Thailand. *KMITL Sci. Tech. J.* 7(S2): 122-126.
- Alean Carreño I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura en Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, D. C. Colombia. pp 116.
- Ali A, H Sermann, C Büttner. 2008. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 73(3):589-96.
- Aluja M. 1993. Manejo Integrado de la Mosca de la Fruta. Edit. Trillas, México D. F. pp. 251.
- Aluja M. 1994. Bionomics y management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology* 39: 155-178.
- Aluja M. 1996. Future trends in fruti fly management. In: McPheron BA and Steck GJ (eds.), *Frut fly pests: a World Assessment of Their Biology and Management*. pp. 309-320. St. Lucie Press, DelRay Beach, Florida, USA.
- Aluja M, A Birke. 1993. Habitat use by adults of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in a mixed mango and tropical plum orchard. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86 (6): 799-812.
- Aluja M. 1999. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) research in Latin America: myths, realities y dreams. *Anais Soc. Entomol. Brasil.* 28: 565-594.
- Aluja M, J Rull. 2009. Managing Pestiferous Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) Through Environmental Manipulation. En: Aluja M, Leskey TC, Vincent C (eds.), *Biorational tree fruit pest management*, CABI, Oxfordshire, UK. pp. 171-213.

- Alves SB. 1998. Controle microbiano de insetos. FEALQ, Piracicaba, Brasil.
- Alves SB, RB López. 2008. Controle microbiano de pragas na America Latina: avanços e desafios. Vol 14. 1° ed. FEALQ, Piracicaba, Sao Pablo, Brasil. pp 414.
- Anderson RM, RM May. 1986. The invasión, persistence, and spread of infectious diseases within animal and plant communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 314: 533-570.
- Aruani R, A Ceresa, JC Granados, G Taret, P Peruzzotti, G Ortiz. 1996. Advances in the national fruit fly control y eradication program in Argentina. In: McPherson BA and Steck GJ (eds.), Fruit fly pests: a world assessment of their biology y management. Delray Beach, Florida, St. Lucie Press. p. 521-530.
- Bateman MA. 1968. Determinations of abundance in a population of the Queensland fruit fly. *Symp. R. Entomol. Soc. Lond.* 4: 119-131.
- Bechara IJ, RHR Destéfano, C Bresil, CL Messias. 2011. Histopathological events and detection of *Metarhizium anisopliae* using specific primers in infected immature stages of the fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). *Braz. J. Biol.* 71(1): 91-8.
- Benny GL, RA Humber, JB Morton. 2001. Zygomycota: Zygomycetes. In: McLaughlin, McLaughlin, Lemke (eds.) The Mycota VII Part A Systematics and Evolution. Springer-Verlag, Berlín.
- Beris EI, DP Papachristos, A Fytrou, SA Antonatos, DC. Kontodimas. 2013. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi on pupae and adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Pest Science.* 86(2): 275-284.
- Blanchard E. 1961. Especies argentinas del género *Anastrepha* Schiner (*sens. lat.*) (Diptera: Trypetidae). *Revista de Investigaciones Agrícolas (Argentina)* 15: 281-342.
- Boucias DG, JD Pendland 1998. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London. pp. 537.
- Boudjelida H, N Soltani. 2011. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on *Ceratitis capitata* L. (Diptera: Tephritidae). *Annals of Biological Research* 2 (2): 104-110.

- Brooks WM. 1993. Host-parasitoid-pathogen interaction. En: Beckage NE, Thompson SN, Frederici BA (eds.), *Pathogens. Parasites and pathogens of insects*. Academic Press, San Diego. 2: 231-272.
- Cañedo V, T Ames. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. pp 62.
- Carswell L, R Spooner-Hart, RJ Milner. 1998. Laboratory susceptibility of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) and *Bactrocera tryoni* (Frogatt) (Diptera: Tephritidae) to an isolate of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Australian Journal of Entomology* 37: 281-284
- Castillo, CF. 2007. Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM. *RCCV* Vol. 1 (2). ISSN: 1988-2688. Disponible en:  
[http://www.google.com.ar/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=12&ved=0CF4QFjAL&url=http%3A%2F%2Frevistas.ucm.es%2Findex.php%2FRCCV%2Farticle%2Fdownload%2FRCCV0707230262A%2F22655&ei=vrSPUritBcq-sQT1pYKIBg&usq=AFQjCNHr5A\\_fnR1v2FgK2uo0gPIIV\\_j8pQ&bvm=bv.56988011,d.cWc](http://www.google.com.ar/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=12&ved=0CF4QFjAL&url=http%3A%2F%2Frevistas.ucm.es%2Findex.php%2FRCCV%2Farticle%2Fdownload%2FRCCV0707230262A%2F22655&ei=vrSPUritBcq-sQT1pYKIBg&usq=AFQjCNHr5A_fnR1v2FgK2uo0gPIIV_j8pQ&bvm=bv.56988011,d.cWc)
- Castillo M A, P Moya, E Hernández, E. Primo-Yúfera. 2000. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. *Biol. Control* 19: 274–282.
- Castillo A, J Gómez, F Infante, FE Vega. 2009. Susceptibilidad del Parasitoide *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) a *Beauveria bassiana* en Condiciones de Laboratorio. *Neotropical Entomology* 38(5): 665-670.
- Celedonio-Hurtado H. 1988. Fluctuación de especies del genero *Anastrepha* Schiner (Diptera: Tephritidae) en huertos de naranja, guayaba, chicozapote y chalum del Soconusco, Chiapas, México. Tesis de grado, Universidad Autónoma de Chiapas, pp.156.
- Cichón L, S Garrido. 2012. Tratamientos invernales en perales y manzanos. *Fruticultura & Diversificación* 68: 8-11. ISBN/ISSN 1669-7057.
- Cichón L, S Garrido, R Gómez D Fernández, L Argañaraz, G Gastaminza. 2011. Evaluation of phosphine gas as a mitigation treatment for the exports of fresh fruits. *Acta Hort.* (ISHS) 909: 479-484. Disponible en:  
[http://www.actahort.org/books/909/909\\_55.htm](http://www.actahort.org/books/909/909_55.htm)

- Conover WJ, Iman RL. 1981. Rank transformation as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *Amer. Statist.* 35:124–129.
- Cossentine J, H Thistlewood, M Goettel, S Jaronski. 2010. Susceptibility of preimaginal western cherry fruit fly, *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) to *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Clavicipitaceae (Hypocreales). *Journal of Invertebrate Pathology* 104: 105–109.
- Cossentine J, Jaronski S, Thistlewood H, Yee WL. 2011. Impact of *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on pre-imaginal *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) within and on the surface of orchard soil. *Biocontrol Science and Technology* 21(12): 1501-1505.
- Daniel C, E Wyss. 2009. Susceptibility of different life stages of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasis*, to entomopathogenic fungi. *J Appl Entomol* 133: 473–483.
- Deshpande MV. 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Crit. Rev. Microbiol.* 25: 229-243.
- De La Rosa W, FL Lopez, P Liedo. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.* 95(1): 36-43.
- Dimbi S, NK Maniania, S Ekesi. 2013. Horizontal Transmission of *Metarhizium anisopliae* in Fruit Flies and Effect of Fungal Infection on Egg Laying and Fertility. *Insects* 4(2): 206-216.
- Dimbi S, NK Maniania, S Ekesi. 2009. Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behavior of three species of African Tephritid fruit flies, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis cosyra* and *Ceratitis fasciventris*. *Biological Control* 50: 111–116.
- D’Mello JPF, MacDonald AMC. 1997. Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69: 155–166.
- Dowd PF, FE Vega. 2003. Autodissemination of *Beauveria bassiana* by sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae) to overwintering sites. *Biocontrol Sci. Technol.* 13:65–75.
- Duperchy E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. Pp.111.

- Ekesi S, S Dimbi, N Maniania. 2007. The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. In: Ekesi S, NK Maniania (eds), Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. pp. 333. Research Signpost. ISBN: 978-81-308-0192-6.
- Ekesi S, NK Maniania, SA Mohamed, SA Lux. 2005. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. *Biological Control* 35: 83–91.
- Ekesi S, NK Maniania, SA Lux. 2003. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 157-167.
- Ekesi S, NK Maniania, SA Lux. 2002. Mortality in Three African Tephritid Fruit Fly Puparia and Adults Caused by the Entomopathogenic Fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* 12(1): 7-17. DOI: 10.1080/09583150120093077.
- FAO. 2003. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación Nutrición 73. pp.130. ISSN 10142916.
- Ferron P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Burges HD (ed.), Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980. pp. 465-482. Academic Press, New York.
- Fogliata MG, NV Canton, LD Plopper 2000. Análisis de laboratorio para certificación de fruta cítrica del NOA con destino a EEUU. Tucumán, AR, *Avance Agroindustrial* 21(4): 4-7.
- Folegatti MEG, SB Alves. 1987. Interacção entre o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., 1883 e os principais parasitoides da broca da cana-de-açúcar *Diatrea saccharalis* (Fabricius, 1794). *Ann. Soc. Entomol. Brasil* 16, 351–355.
- Foote RH. 1981. The genus *Rhagoletis* Loew south of the United States. U.S. Dep. Agric. Tech. Bull. 1607: 75.
- Foote RH, FL Blanc, AL Norrbom. 1993. Hybook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America north of Mexico. Cornell University Press. pp. 571. Ithaca, New York, USA

- Forman RTT. 1997. Land mosaics: the ecology of landscapes and regions. Cambridge University press, Cambridge, United Kingdon. pp 632.
- Freeman J, GB Hutchinson. 1980. Prevalence, incidente and duration. *Am J Epidemiol.* 112: 707-723.
- Furlong MJ, JK Pell. 2005. Interactions between Entomopathogenic Fungi and Arthropod Natural Enemies. En: Vega FE, Blackwell M (eds.), Insect-Fungal Associations. Ecology and Evolution Oxford Universiti Press, Inc., New York. pp 51-73.
- Gandarilla-Pacheco FL, HD Nava-González, K Arévalo-Niño, L JmGalán-Wong, M Elías-Santos, I Quintero-Zapata. 2012. Evaluation of Native Strains of *Isaria fumosorosea* (Wize) Against *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Life Sciences* 6: 957-960.
- Gandolfo DE. 2004. Tephritinae. En: Cordo H, Logarzo G, Braun K y Di Iorio O (eds.), Catálogo de Insectos Fitófagos de la Argentina y sus Plantas Asociadas. Sociedad Entomológica Argentina ediciones, Bs. As., Argentina. p. 225-231.
- García MA, J Ivaldai. 2000. La actividad citrícola de Tucumán: evolución durante el año 2000. *Horizonte agroindustrial* 1: 8-11.
- Garrido-Jurado I, J Torrent, V Barrón, A Corpas, E Quesada-Moraga. 2011a. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biol. Control* 58: 277–285.
- Garrido-Jurado I, P Valverde-García, E Quesada-Moraga. 2011b. Use of a multiple logistic regression model to determine the effects of soil moisture and temperature on the virulence of entomopathogenic fungi against pre-imaginal Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Biological Control* 59: 366–372.
- Giraldo J. 2009. Uso de hongos entomopatógenos en el control de ectoparásitos. Universidad del Tolima. Artículo de divulgación, Revista Ganadero. Tolima, Colombia. Disponible en: <http://www.engormix.com/MAGanaderia-carne/sanidad/articulos/uso-hongos-entomopatogenos-control-t2540/p0.htm>
- Goettel MS, TJ Poprawski, JD Vandenberg, Z Li, DW Roberts. 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird M and Davidson EW (eds.), Safety of microbial insecticides. pp 209-232. Boca Raton, FL: CRC Press.

- González RH. 1978. Introduction and spread of agricultural pests in Latin America: analysis and prospects. *FAO Plant Protection Bulletin* 26: 41-52.
- Grau HR, R Aragón. 2000. Árboles invasores de la Sierra de San Javier, Tucumán, Argentina. En: H. R. Grau y R. Aragón (eds.), *Ecología de árboles exóticos en las Yungas argentinas*. p. 5-20. LIEY, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Guillén D, R Sánchez. 2007. Expansion of the national fruit fly control programme in Argentina. In: Vreysen MJ B, Robinson AS and Hendrichs J (eds.), *Area-Wide Control of Insect Pests: from research to field implementation*. p. 653-660. Springer, The Netherlands.
- Hajek AE, St. Leger RJ. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- Hajek AE. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Adv. Microb. Ecol.* 15: 193-249.
- Hajek AE, Delalibera I. 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl.* 55: 147-158.
- Hawksworth D. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research.* 95(6): 641-655.
- Hernández Díaz-Ordaz N, N Pérez, J Toledo. 2010. Patogenicidad de tres cepas de hongos entomopatógenos a adultos de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) en condiciones de laboratorio. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 26(3): 481-494.
- Hibbett DS, M Binder, JF Bischoff, M Blackwell, PF Cannon, OE Eriksson, S Huhndorf, T James, PM Kirk, R Lücking, H Thorsten Lumbsch, F Lutzoni, PB Matheny, DJ Mc Laughlin, MJ Powell, S Redhead, CL Schoch, JW Spatafora, JA Stalpers, R Vilgalys, MC Aime, A Aptroot, R Bauer, D Begerow, GL Benny, LA Castlebury, PW Crous, Y Dai, W Gams, DM Geiser, GW Griffith, C Gueidan, DL Hawksworth, G Hestmark, K Hosaka, RA Humber, KD Hyde, JE Ironside, U Koljalg, CP Kurtzman, K Larsson, R Lichtwardt, J Longcore, J Mia Dlikowska, A Miller, J Moncalvo, S Mozley-Standridge, F Oberwinkler, E Parmasto, V Reeb, JD Rogers, C Roux, L Ryarden, J Sampaio, A Schußler, J Sugiyama, RG Thorn, L Tibell, WA Untereiner, C Walker, Z Wang, A Weir, M Weiss, MM White, K Winka, Y Yao, N Zhang. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 3: 509– 547.

- Hodge KT. 2003. Clavicipitaceous Anamorphs. En: White JF, Bacon CW, Hywel Jones NL and Spatafora JW (eds.), Clavicipitaceous fungi, evolutionary biology, chemistry biocontrol and cultural impacts. Marcel Dekker, NY.
- Humber RA. 1997. Fungi: Identification En: Manual of Techniques in Insect Pathology. Lacey L (ed.), Academic Press. p. 53-185. San Diego, California.
- Humber RA. 2012. *Entomophthoromycota*: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. *Mycotaxon* 120: 477-492.
- INTA. 1996. Disponible en: [http://inta.gob.ar/documentos/manual-para-productores-de-naranja-y-mandarina-de-la-region-del-rio-uruguay/at\\_multi\\_download/file/INTA\\_manual%20citricultura%20cap11.pdf](http://inta.gob.ar/documentos/manual-para-productores-de-naranja-y-mandarina-de-la-region-del-rio-uruguay/at_multi_download/file/INTA_manual%20citricultura%20cap11.pdf)
- Imoulan A, A Alaoui, A ElMeziane. 2011. Natural occurrence of soil-borne entomopathogenic fungi in the Moroccan Endemic forest of *Argania spinosa* and their pathogenicity to *Ceratitis capitata*. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 2619–2628.
- Imoulan A, A Elmeziane. 2013. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* isolated from Moroccan Argan forests soil against larvae of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in laboratory conditions. *World J. Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s11274-013-1514-y
- Jackson TA, SB Alves, RM Pereira. 2000. Success in biological control of soil-dwelling insects by pathogens and nematodes. In: Gurr G and Wratten S (eds.), Biological control: measures of success. p. 271–296. Kluwer Academic Public Publishers, Boston.
- Kaaya GP, MA Okech. 1990. Horizontal transmission of mycotic infection in adult tsetse, *Glossina morsitans morsitans*. *Entomophaga* 35: 589-600.
- Kaaya GP. 1989. *Glossina morsitans morsitans*: Mortalities in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. *Acta Trop*. 46: 107-114.
- Kogan M, M Shenk. 2002. Conceptualización del manejo integrado de plagas en escalas espaciales y niveles de integración más amplios. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica) 65: 34-42.
- Konstantopoulou MA, BE Mazomenos. 2005. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. *BioControl* 50: 293-305.

- Lacey L, WM Brooks. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insects. En: Lacey LA (ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. San Diego, California: Academic Press.
- Lane BS, AM Humphreys, K Thompson, APJ Trinci. 1988. ATP content of stored spores of *Paecilomyces farinosus* and the use of ATP as a criterion of spore viability. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 90:109-148.
- Lawton JH. 1983. Plant architecture and the diversity of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 28: 23-29.
- Lecuona RE. 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Ed. Buenos Aires, Argentina: Talleres gráficos Mariano.
- Lezama-Gutiérrez R, A Trujillo de la Luz, J Molina-Ochoa, O Rebolledo-Dominguez, AR Pescador, M Lopez-Edwards, M Aluja. 2000. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field trials. *J. Econ. Entomol.* 93, 1080-1084.
- Lord JC. 2001. Response of the wasp *Cephalonomia tarsalis* (Hymenoptera: Bethyridae) to *Beauveria bassiana* (Hiphomycetes: Moniliales) as free conidia or infection in its host, the sawtoothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). *Biological Control* 21: 300-304.
- Lozano-Tovar MD, A Ortiz-Urquiza, I Garrido-Jurado, A Trapero-Casas, E Quesada-Moraga. 2013. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. *Biological Control* 67: 409–420.
- Lipa JJ, K Borusiewicz, S Balazy. 1976. Noxiousness of the rose fruit fly *Rhagoletis alternata* and infection of its puparia by a fungus *Scopulariopsis brevicaulis*. Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences Serie des Sciences Biologiques 24: 451-456.
- Mahmoud Mahmoud Farag. 2009a. Susceptibility of the Peach Fruit Fly, *Bactrocera zonata* (Saunders), (Diptera: Tephritidae) to Three Entomopathogenic Fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 19(2): 169-175.
- Mahmoud Mahmoud Farag. 2009b. Pathogenicity of Three Commercial Products of Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Lecanicillium lecanii* against Adults of Olive Fly, *Bactrocera*

- oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) in the Laboratory. *Plant Protect. Sci.* 45(3): 98–102.
- Maurer P, Y Couteaudier, PA Girard, PD Bridge, G Riba. 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol. Res.* 101: 159-164.
- Malavasi A, A Van Sauers-Muller, D Midgarden, V Ellman, D Didelot, O Ribeiro. 1999. The status of the carambolae fruit fly eradication program in South America – middle. Taller internacional sobre programas de control y erradicación de moscas de los frutos. p 19-19. Buenos Aires, Argentina.
- Maniania NK, C Laveissiere, A Odulaja, S Ekesi, HR Herren. 2003. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents for tsetse flies. In: Upadhyay RK (ed.), *Advances in Microbial Control of the Insect Pests*. pp.146. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Mar TT, S Lumyong. 2012. Evaluation of Effective Entomopathogenic Fungi to Fruit Fly Pupa, *Bactrocera* spp. and Their Antimicrobial Activity. *Chiang Mai J. Sci.* 39(3): 464-477.
- Marino PC, DA Landis. 1996. Effect of landscape structure on parasitoid diversity and parasitism in agroecosystems. *Ecological Applications* 6: 276-284.
- Meyling NV, J Eilenberg. 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agric. Ecosyst. Environ.* 113: 336–341.
- Milner JR. 2000. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News Inf.* 20: 47-50.
- Mochi DA, AC Monteiro, SA De Bortoli, HOS Doria, JC Barbosa. 2006. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. *Neotrop. Ent.* 35:382–389.
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas. (CATIE, Costa Rica)* 63: 95-103.
- Muñoz JA, W De la Rosa, J Toledo. 2009. Mortalidad de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) por diversas cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, en condiciones de laboratorio. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 25(3): 609-624. ISSN 0065-1737

- Murrin F. 1996. Fungi and insects. In: Howard DH and Miller JD (eds.), The Mycota VI. Human and Animal Relationship. pp. 365-388. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Norrbom AN, RH Foote. 1989. The taxonomy and zoogeography of the genus *Anastrepha* sp. (Diptera: Tephritidae). In: Robinson AS and Hooper G (eds.), Fruit Flies, their biology, natural enemies and control. 3A: 15-16. World crop pests. Elsevier Amsterdam.
- Norrbom AL. 1994. New species and phylogenetic analysis of *Cryptodacus*, *Haywardina* y *Rhagoletotrypeta* (Diptera: Tephritidae). *Insecta Mundi* 8: 37-65.
- Norrbom AL, LE Carroll, FC Thompson, IM White, A Freidberg. 1999. Systematic database of names. In: Thompson FC (ed.), Fruit Fly Expert Identification System y Systematic Information Database, (1998) *Myia* 9: 65-251.
- Norrbom AL, RA Zucchi, V Hernández-Ortiz. 2000. Phylogeny of the genera *Anastrepha* y *Toxotrypana* (Trypetidae: Toxotrypanini) based on morphology, In: Aluja M and Norrbom AL (eds.), Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny y Evolution of Behavior. pp. 299-342. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Norrbom AL. 2004. Host plant database for *Anastrepha* and *Toxotrypana* Diptera: Tephritidae: Toxotrypanini. En: Diptera Data Dissemination Disk 2, <http://www.sel.barc.usda.gov:591/diptera/Tephritidae/TephIntro.html>
- Norrbom AL, CHA Korytkowski. 2007. A new species, new synonymy, and taxonomic notes in the *Anastrepha schausi* group (Diptera: Tephritidae). *Zootaxa* 1497: 47-55.
- Ortu S, A Cocco, R Dau. 2009. Evaluation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* strain ATCC 74040 for the management of *Ceratitis capitata*. *Bulletin of Insectology* 62 (2): 245-252. ISSN 1721-8861.
- Osorio-Fajardo A, NA Canal. 2011. Selección de Cepas de Hongos Entomopatógenos para el Manejo de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) en Colombia. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 64(2): 6129-6139.
- Ovruski SM, P Schliserman, M. Aluja. 2003. Native y introduced host plants of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Northwestern Argentina. *J. Econ. Entomol.* 96: 1108-1118.

- Ovruski SM, A Norrbom, P Schliserman, M Aluja. 2005. Biology y taxonomy of *Rhagoletotrypeta* (Diptera: Tephritidae): A new species from Cuba y new host plant, parasitoid y distribution records from Northwestern Argentina. *Annals of the Entomological Society of America* 98 (3): 252-258.
- Oruski SM, P Schliserman. 2012. Biological Control of Tephritid Fruit Flies in Argentina: Historical Review, Current Status, and Future Trends for Developing a Parasitoid Mass-Release Program. *Insects* 3: 870-888.
- Papierok B, AE Hajek. 1997. Fungi: Entomophthorales. In: Lacey L (ed.) *Manual of Techniques in Insect Pathology*. pp.187-211. San Diego, California: Academic Press.
- Pedrini N, R Crespo, MP Juárez. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 124-137.
- Peraica M, B Radic, A Lucic, M Pavlovic. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Org.* 77: 754-763.
- Porras L, R Lecuona. 2008. Estudios de laboratorio para el control *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (Diptera : Tephritidae) (Mosca del Mediterráneo) con *Beauveria bassiana*. *Agronomía Costarricense* 32(2): 119-128. ISSN: 0377-9424.
- Pucheta Diaz M, A Flores Macías, S Rodríguez Navarro, M de la Torre. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *INCI, Caracas* 31(12): 856-860 Disponible en:  
[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&nrm=iso)
- Quesada-Moraga E, A Ruiz-García, C Santiago-Álvarez. 2006. Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against Puparia and Adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 99(6) 1955-1966.
- Quiroga D, W Ramirez, C Ruiz. 2010. National Fruit Fly Control and Eradication Program (PROCEM) Argentina. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. pp. 100-101.
- Rodrigues Destéfano RH, IJ Bechara, CL Messias, AE Piedrabuena. 2005. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against immature stages of

- Anastrepha fraterculus* fruitfly (Diptera: Tephritidae). *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 94-99.
- Rosenhein JA, M Hoy. 1987. Confidence intervals for Abbott's Formula correction of bioassay data for control response. *J. Econ. Entomol.* 82(2): 331-335.
- Sabbour MM, A Abd El-Rahman, MA Abd- El-Raheem, M Ragei. 2012. Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi Against Olive Insect Pests Under Laboratory and Field Conditions. Egypt. *Journal of Applied Sciences Research.* 8(7): 3448-3452. ISSN 1819-544X.
- Samson RA, HC Evans, JP Latgé. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Ed. Springer-Verlag.
- Schliserman P, S Ovruski, C Colin, AL Norrrbom, M Aluja. 2004. First report of *Juglans australis* (Juglyaceae) as a natural host plant for *Anastrepha schultzi* (Diptera: Tephritidae) with notes on probable parasitism by *Doryctobracon areolatus*, *D. brasiliensis*, *Opius bellus* (Braconidae) y *Aganaspis pelleranoi* (Figitidae). *Florida Entomologist* 87: 597-599.
- Schoonhoven LM, T Jermy, JJA Van Loon. 1998. Insect-plant biology. From physiology to evolution. En: Perturbación, estructura del hábitat y diversidad de insectos en ecosistemas de bosque Chaqueño y de pastizales serranos. Tesis doctoral Molina, S. I. 1999. Universidad Nacional de Córdoba.
- SENASA. 2012a.  
<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1573&io=21901>
- SENASA. 2012b. Mosca de los frutos - emergencia fitosanitaria. Pdf disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=661&io=2637>
- SENASA. 2006.  
<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=878&io=4751>
- SENASA. 1994.  
<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1082&io=4791>
- Shah PA, JK Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 61: 413-423.

- Shapiro SL, JA Astin, SR Bishop, M Cordova. 2005. Mindfulness-based stress reduction for health care professionals: Results from a randomized trial. *Int. J. Stress Manage.* 12 (2): 164-176.
- Sookar P, S Bhagwant, E Awuor Ouna. 2008. Isolation of entomopathogenic fungi from the soil and their pathogenicity to two fruit fly species (Diptera: Tephritidae). *J. Appl. Entomol.* 132: 778–788.
- Sosa-Gómez DR, F Moscardi. 1994. Effect of till soybean cultivation on dynamics of entomopathogenic fungi in the soil. *Florida Entomologist* 77: 284-287.
- Sosa-Gómez DR, CC López Lastra, RA Humber. 2010. An overview of Arthropod-Associated Fungi from Argentina and Brazil. *Mycopathol* 170: 61-76.
- Southwood TRE. 1978. Ecological methods. En: *Perturbación, estructura del hábitat y diversidad de insectos en ecosistemas de bosque Chaqueño y de pastizales serranos*. Tesis doctoral Molina, S. I. 1999. Universidad Nacional de Córdoba.
- Spinetta M. 2004. National Fruit Fly Control y Eradication Program in Argentina. pp. 144. In: *Proceedings of the 5<sup>th</sup> WGFFWH meeting*, University of Florida-IFAS, FL., USA.
- StatSoft, Inc. (2004), STATISTICA (data analysis software system), version 7. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)
- St. Leger RJ, DW Roberts. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol.* 15: 83-87.
- Stolz I. 1996. Die Wirkung des zur Heuschreckenbekämpfung eingesetzten entomopathogenen Pilzes *Metarhizium xavoviride* Gams & Rozsypal (Deuteromycotina: Moniliales) auf den Parasitoiden *Apoanagyrus (Epidinocarsis) lopezi* De Santis (Hymenoptera: Encyrtidae). Thesis, Department of Agronomical Sciences, Georg- August University, Göttingen, Germany.
- Strong DR, JH, Lawton, JH, TRE Southwood. 1986. Insect on plants. En: *Perturbación, estructura del hábitat y diversidad de insectos en ecosistemas de bosque Chaqueño y de pastizales serranos*. Tesis doctoral Molina, S. I. 1999. Universidad Nacional de Córdoba.
- Suarez L, G A Van Nieuwenhove, F Murua, LP Bezdjian, P Schliserman, N Lara, J Escobar, SM Ovruski. 2012. Offspring Production in Response to

- Host Exposure Times in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), Reared on the Genetic Sexing Strain Vienna 8 of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 95(4): 991-999.
- Sung GH, NL Hywel-Jones, JM Sung, JJ Luangsa-ard, B Shreshtha, JW Spatafora. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.* 57: 5-59.
- Tanada Y, H Kaya. 1993. Insect Pathology. Academic Press, San Diego, California, USA. pp. 666.
- Toledo J, SE Campos, S Flores, P Liedo. 2007. Horizontal Transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Under Laboratory and Field Cage Conditions. *J. Econ. Entomol.* 100(2): 291-297.
- Toledo J, P Liedo, S Flores, SE Campos, A Villasenor, P Montoya. 2006. Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Fruit Fly Control: A Novel Approach. In: Fruit Flies of Economic Importance: From Basic to Applied Knowledge. Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Salvador, Brazil. pp. 127-132
- Uziel A, K Levy, B Yuval. 2003. Infection of *Ceratitis capitata* by two species of the *Entomophthora muscae* species complex (Zygomycetes: Entomophthorales) in the field. *Phytoparasitica* 31: 1-3.
- Varela A, Morales E. 1996. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 67: 147-152.
- Vega EF, M Blackwell. 2005. Insect fungal associations. Ecology and Evolution. Oxford University Press, Inc. USA.
- Vélez AP, M Gonzáles, A Valderrama, M Estrada, A Bustillo, E Montoya. 2000. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*. *CENICAFE.* 51(3): 196-206.
- Vera MT, R Rodríguez, DF Segura, JL Cladera, RW Sutherst. 2002. Potencial geographical distribution of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), with emphasis on Argentina and Australia. *Environ. Entomol.* 31: 1009-1022.
- Vergani AR. 1952. La mosca del mediterráneo. Publicación del Instituto de Sanidad Vegetal (Argentina), Serie B, No. 22, 12 p.

- Vilcinskis, A., P. Götz, 1999. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Advances in Parasitology* 43:267–313
- Vinson SB. 1990. Potential impact of microbial insecticides on beneficial arthropods in the terrestrial environment. En: Laird M, Lacey LA, Davidson EW (eds.), *Safety of microbial insecticides*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 43-64.
- Viscarret MM, R La Rossa, DF Segura, SM Ovruski, JL Cladera. 2006. Evaluation of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) reared on a genetic sexing strain of *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 36: 147-153.
- Waage JK, MP Hassell. 1982. Parasitoids as biological control agents – A fundamental approach. *Parasitology* 84: 241-268.
- Wessels JGH. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genet. Biol.* 27: 134-145.
- WHO-IARC (World Health Organization International Agency for Research on Cancer). 1993. Ochratoxin A, p. 489-521. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, volumen 56. IARC, Lyon, Francia.
- Yee WL, LA Lacey. 2005. Mortality of different life stages of *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) exposed to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Entomological Science* 40(2): 167-177.