

Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Córdoba

Área de Consolidación

SISTEMAS AGRÍCOLAS DE PRODUCCIÓN EXTENSIVOS

Estudio del efecto de *Beauveria bassiana* sobre el complejo de orugas defoliadoras en soja.



ESTUDIANTE: Milene Rocío Barcenilla

COORDINADOR: Ing. Agr. Gustavo Giambastiani

TUTOR: Ing. Agr. Alejandro A. Pérez

2021



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

INDICE

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	5
Origen, distribución del cultivo de soja.....	5
Control biológico: utilización de hongos, virus y bacterias.	7
Beauveria bassiana.	8
Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos.....	8
(1) Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero y germinación de la espora.....	8
(2) Penetración en el hemocele	9
(3) Replicación en el hemocele	9
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
1. Producción y formulación de <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	11
2. Determinación de la calidad de <i>Beauveria bassiana</i>.....	12
▪ Porcentaje de germinación o viabilidad.....	13
▪ Pureza.....	14
3. Ensayos in vitro sobre <i>Tenebrio molitor</i> (Tenebrios).....	15
4. Ensayo in vivo sobre el complejo de orugas defoliadoras	15
4.1. En invernadero.....	15
4.2. A campo.....	15
Muestreos.....	16
RESULTADOS Y DISCUSION.....	18
Determinación de la calidad: Recuento de esporas, porcentaje de germinación o viabilidad y pureza.	18
Ensayos in vitro sobre <i>Tenebrio molitor</i>	18
Ensayo in vivo sobre el complejo de orugas defoliadoras.	19
Medición del efecto de <i>Beauveria bassiana</i> en el porcentaje de defoliación.	23
CONCLUSIONES:.....	25
BIBLIOGRAFÍA	26

Publicaciones y artículos citados y consultados	26
Sitios web	28
ANEXO.....	29

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al cuerpo docente de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por guiarme en mi formación profesional y a quienes aportaron todas las bases y conocimiento para que se lleve a cabo este trabajo académico integrador (TAI).

En especial al Ing. Agr. Alejandro Pérez, docente de la Catedra de Fitopatología y tutor del TAI, por su enseñanza y acompañamiento en cada detalle del mismo.

A los integrantes del Lab. De Fitopatología, por su ayuda en la preparación y mantenimiento de materiales vivos (Tenebrios y cepa de *Beauveria bassiana*).

Al Ing. Agr. Juan Edwards del EEA INTA Balcarce, por su trabajo importante en la ayuda del análisis de los datos recolectados en el ensayo a campo.

Al equipo docente de la Catedra de Zoología Agrícola, por sus conocimientos brindados en mi formación durante los años como ayudante alumna.

Agradecimiento especial a mi gran familia por elección, mis amigos y amigas que fui conociendo durante el cursado y la vivencia en Córdoba, fueron de gran apoyo e incondicionales.

Por último, a toda mi familia y en especial a Graciela Ferrero y Ernesto Barcenilla (mis padres), Alba y Nicolás (mis hermanos). Siempre presentes a pesar de la distancia.

INTRODUCCIÓN

Origen, distribución del cultivo de soja

La soja cuyo nombre científico es *Glycine max* (L.) Merr. es nativa del este asiático. Las primeras plantaciones en el país se hicieron en 1862, pero no encontraron eco en el campo argentino de aquellos años (Piquin, A. 1968; Zeni, E. R. 1971). En 1909 se comenzó a ensayar en distintas Escuelas Agrícolas y entre 1910 y 1920 se realizaron ensayos en la Estación Experimental Agronómica de Córdoba, anexa a la Escuela de Agronomía y Ganadería de la Provincia (Pascale, A. J. 1989).

En las últimas décadas la soja se ha convertido en el cultivo con mayor distribución (Fig. N° 1.), tanto espacial como temporal, debido a la gran plasticidad que presentan las distintas variedades disponibles en el mercado para adaptarse a los diversos sitios y fechas de siembra. También es importante por cuestiones ambientales, desde que existen controversias respecto de los impactos que su expansión y la tecnología de producción tienen sobre suelos, aguas y la salud humana. (Dotti de Araujo, V., 2019)

La soja es el principal cultivo de la Argentina no sólo por la producción, sino por la superficie ocupada. En la actualidad representa el 55% de los casi 37 millones de hectáreas que se siembran, seguida muy de lejos por los cultivos de maíz y trigo que en conjunto representan el 26%, menos de la mitad. (Ybran, R., et al., 2016).

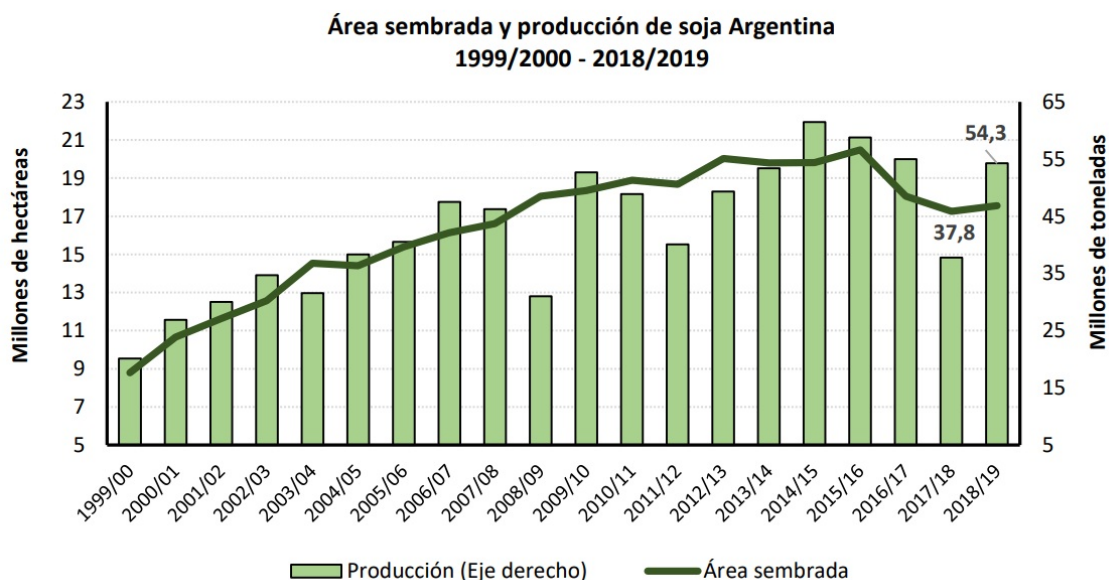


Fig. N° 1: Área sembrada y producción de soja en Argentina. Fuente: BCCBA. En base a datos de la Secretaría de Agroindustria

La agricultura moderna implica la simplificación de la estructura ambiental de grandes áreas, reemplazando la biodiversidad natural por un pequeño número de plantas cultivadas y animales domésticos. Las consecuencias de la reducción de la biodiversidad (Nastis, S. et al., 2013) son particularmente evidentes en el control de

plagas agrícolas (Altieri, M. y Nicholls, C. 2007; Letourneau, D. *et al.*, 2011). Una de las manifestaciones de la inestabilidad de los agroecosistemas es el incremento en la agresividad de las plagas y enfermedades, íntimamente ligado al monocultivo y al uso intensivo de agroquímicos. Además, aumentó el uso de agua y la pérdida de las capas más superficiales y más fértiles del suelo. Es decir que el aumento de la producción obtenido por las nuevas tecnologías, fue posible con un alto costo para el medio ambiente (Relyea, R. 2005; Blann, K. *et al.*, 2009; Foley, J. *et al.*, 2011).

En Argentina, el mercado de agroquímicos muestra una evolución creciente y sostenida. En 1991 se utilizaron 100 millones de litros de productos químicos, mientras que en 2012 se aplicaron 317 millones de litros. La producción de soja acaparó casi el 62 % del total de los productos aplicados (Zarrilli, A. 2008). (Fig. N°2).

Debido a que en general los efectos son más rápidos que otras formas de control y a que son fácilmente manejables, los agroquímicos constituyen un recurso fundamental contra las plagas y enfermedades. Desafortunadamente, la utilización de los pesticidas produjo fenómenos no previstos (Georghiou, G. 1990; Sparks, G. y Nauen, R. 2015). La falta de especificidad de dichos productos afecta a organismos benéficos, como predadores naturales y polinizadores, por un efecto directo o indirecto por alteración de su hábitat. La aplicación continua de plaguicidas ejerce además una presión de selección sobre las plagas favoreciendo la aparición de individuos resistentes, obligando así al uso de dosis mayores. Igualmente, el uso de agroquímicos constituye una de las fuentes de contaminación del medio ambiente poniendo en riesgo la salud del hombre y de los recursos genéticos de nuestro planeta (Rifkin, J. 2011; Villaamil Lepori, E. *et al.*, 2013).

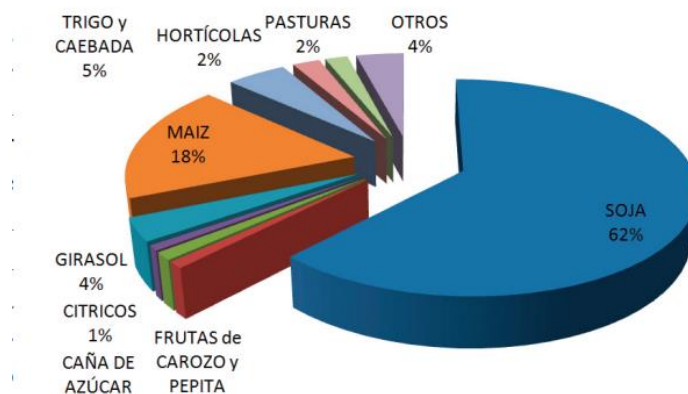


Fig. N° 2: Distribución del uso de agroquímicos en diferentes cultivos en Argentina.

La recopilación de datos en la literatura permite concluir que: (i) es recomendable la aplicación de una estrategia de manejo integrado de orugas en soja, (ii) el primer paso hacia el uso de un conjunto de estrategias es el correcto monitoreo, (iii) emplear insecticidas sólo cuando sea necesario, evitando los convencionales no selectivos, (iv) priorizar los denominados IGR (Insect Growth Regulator), que afectan la muda del

insecto y son altamente específicos para orugas y por ende no afectan la fauna benéfica, y (v) profundizar el conocimiento de las herramientas de control biológico, incluyendo a los parasitoides y hongos entomopatógenos como enemigos naturales efectivos. (Dotti de Araujo, V., 2019)

Entre los factores adversos que afectan la productividad aparecen los ataques de plagas insectiles, especialmente las "orugas defoliadoras" que, si bien no se presentan todos los años, pueden generar daños en la producción. Las especies que predominan son *Rachiplusia nu* (oruga medidora) y *Anticarsia gemmatalis* (oruga de las leguminosas) a las que en las últimas campañas se han agregado *Helicoverpa gelotopoeon* (oruga bolillera), y *Spodoptera frugiperda* (Smith) (oruga cogollera, oruga militar tardía) *Spodoptera cosmiodes* Walker (oruga del yuyo colorado). (Dotti de Araujo, V., 2019)

Control biológico: utilización de hongos, virus y bacterias.

El control biológico puede definirse como: "El uso de organismos vivos para reducir la densidad poblacional o el impacto de un organismo plaga específico, haciendo a esta menos abundante o menos perjudicial de lo que sería de otra manera" (Eilenberg, J. *et al.*, 2001).

En los últimos años ha sido de gran importancia para la comunidad científica, buscar formas de preservar el ambiente y evitar el desbalance ecológico al introducir sustancias sintéticas nocivas. Por este motivo se exploró desde hace algunas décadas la incorporación de microorganismos como bacterias, hongos, nematodos y virus como bioinsecticidas (Valenzuela, E. 1987)

De los diferentes microorganismos empleados, los hongos tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticida de contacto (Charnley, A. y Collins, S. 2007).

A nivel mundial, las dos especies más frecuentes y estudiadas de hongos entomopatógenos son *Beauveria bassiana* y *Metharhizium anisopliae*, debido a su eficiencia y facilidad de multiplicación, (Allendes, G. 2007; Rodríguez, M. *et al.*, 2006), por lo cual éstos pueden servir de agentes entomopatógenos, contra organismos patógenos causantes de enfermedades, o de organismos que sirven de vectores de otros microorganismos que causan daño a plantaciones, animales y al propio ser humano (Scholte, E. *et al.*, 2004)

Los baculovirus junto con la bacteria esporulada *Bacillus thuringiensis* y algunas especies de hongos, representan los tres grupos de entomopatógenos que mayor atención han recibido para su desarrollo como bioinsecticidas (Salvador, R. 2010).

del apresorio para comenzar la fase de penetración (Tanada, Y. & Kaya, H. 1993; Pedrini, N. *et al*, 2007).

(2) Penetración en el hemocele

La penetración, se lleva a cabo por la acción combinada de dos mecanismos uno físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada apresorio, la cual deforma primariamente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosa de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada de hongo (Monzón, A. 2001).

(3) Replicación en el hemocele

Después de llegar a la hemocele la mayoría de los hongos realizan transición dimórfica de micelio a levadura y una vez que han evadido el sistema inmune del insecto, se produce una septicemia.

La micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamiento alterado y parálisis. La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Bustillo, A. 2001).

Los metabolitos insecticidas producidos por hongos tienen varios modos de acción y en muchos casos suelen ser la causa directa de la muerte del insecto, actuando sobre las células especializadas del sistema inmune para evitar su ataque a las estructuras invasivas de los hongos. (Téllez–Jurado, A. *et al.*, 2009).

Por último, cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, las hifas del hongo emergen nuevamente al exterior del cadáver del insecto, donde esporula. La esporulación ocurre generalmente en cadáveres, pero puede también ocurrir en insectos vivos (Tanada, Y. y Kaya, H., 1993).



Fig. Nº 6: Ciclo de desarrollo de un hongo entomopatógeno. Extraído de Redagráfica (2017).

HIPÓTESIS

El hongo *Beauveria bassiana* controla eficientemente el complejo de orugas defoliadoras en soja.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de *Beauveria bassiana* sobre el complejo de orugas defoliadoras en soja.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una multiplicación masiva de *Beauveria bassiana* para poder ser utilizada a gran escala.
- Medir parámetros de calidad de *Beauveria bassiana*: concentración, viabilidad, y pureza.
- Realizar ensayos in vitro sobre insectos del género *Tenebrio*.
- Realizar ensayos in vivo sobre el complejo de orugas defoliadoras en soja.
- Medir el efecto de *Beauveria bassiana* en parámetros fisiológicos tales como porcentaje de defoliación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Producción y formulación de *Beauveria bassiana* (Bb)

Beauveria bassiana cepa Bb, pertenece a la colección de hongos del Centro del Transferencia de Bioinsumos (CeTBio) de la FCA-UNC, aislada de insectos recolectados de la provincia de Córdoba, de un campo cercano a la localidad de Jesús María. La selección se realizó considerando sus aptitudes en el control de orugas defoliadoras.

Se partió de placas Petri con colonias provenientes de cultivos monospóricos de la cepa Bb seleccionada, utilizando como medio de cultivo general agar papa glucosado (APG). Posteriormente se multiplicó en un sustrato sólido y estéril a base de maíz. Por último, se obtuvieron las esporas y micelio en una suspensión líquida (agua destilada) para su aplicación.

-Producción de Bb a partir de sustrato sólido. (Anexo- Fig. N° 24)

Se utilizó como sustrato granos de maíz sin residuos de pesticidas, el cual fue previamente hervido hasta obtener una consistencia semi-blanda, el tiempo de cocción fue de media hora. Posterior a esto se procedió a triturar los granos de maíz en una licuadora industrial, colocando 50 gr. en frascos de 360cc., con tapa perforada y un tapón de algodón para permitir el intercambio de oxígeno, recordando que este hongo crece en condiciones de aerobiosis.

Por último, se llevaron los frascos a la autoclave durante 40 minutos a 1,5 atmósferas de presión y 120°C. A partir de los frascos esterilizados y en cámara de flujo laminar se colocó un disco de 0,5 cm de diámetro de agar con esporas de Bb por frasco, incubando los mismos durante 7 días en cámara de cría a 25°C y con una alternancia de luz/oscuridad de 12hs. esta metodología es la que se utiliza en CeTBio para fermentar varios hongos Fitopatógenos y Biocontroladores.

-Formulación a partir del sustrato sólido para obtener una suspensión de conidios en agua destilada esterilizada. (Anexo- Fig. N° 25)

Este proceso se adaptó de la metodología que se usaba en CeTBio para formular otros microorganismos.

En un balde previamente sanitizado con hipoclorito de sodio al 1%, se vaciaron 13 frascos de maíz inoculados, con la finalidad de obtener 10 litros de una suspensión de conidios de concentración 1×10^9 conidios/ml (este valor de referencia es en base a una recopilación bibliográfica que se realizó a diferentes productos comerciales). En los frascos vacíos, se colocó 50 ml de agua destilada y se lo agitó bien para desprender los restos de hongo que pudieran haber quedado. Se vació el líquido de cada uno en el balde con maíz. Utilizando guantes y mascarilla con filtros de carbón activado, se procedió a agitar y apretar la mezcla hongo y maíz, para extraer la mayor cantidad de esporas e hifas que pueda estar contenida en esa masa de maíz triturado. Una vez que el maíz quedó totalmente limpio, sin parte de hongos se procedió al colado, usando el colador de granulometría gruesa. El líquido ya colado se colocó en

un balde de 20 litros con canilla. Mientras tanto, sobre el colador, a medida que cayó el maíz más el líquido, se siguió friccionando en el interior del colador. Para terminar de sacar las esporas que podrían haber quedado en el grano. Seguidamente se colocó debajo de la canilla del balde de 20 litros, un bidón con un embudo en la boca y sobre éste se colocó el colador de menor granulometría. Se abrió lentamente la canilla para que salga el formulado. El líquido pasó por el colador y terminó de filtrarse. Se cerró bien el bidón y se enjuagó por fuera. Finalmente, los envases con *Bb* se guardaron en cámara fría a 4° C y en oscuridad.

2. Determinación de la calidad de *Beauveria bassiana*

Para una correcta aplicación de *Bb* a campo, se procedió a determinar la concentración, viabilidad y pureza del inóculo fúngico. Dichos parámetros se midieron por el método de dilución seriada con recuento de esporas en cámara de Neubauer y posterior siembra en placa de Petri en medio APG.

Recuento de esporas mediante el método de dilución seriada y recuento en cámara de Neubauer. (Anexo- Fig. N° 26)

Adaptado de Caballero, W.A., Senés, P. J., Toumanián, A. G, 2016. Se determinó la cantidad de conidios típicos de *Bb* presente en 1 g de producto final. De cada 10 frascos preparados, se tomó un frasco al azar y se llevó a la cámara de flujo laminar, se abrió y se tomó 1 g de sustrato de maíz con conidios, colocándolo en un tubo con 10 ml. de agua destilada esterilizada obteniendo la suspensión madre.

Luego de esa suspensión madre contenida en el tubo de ensayo se tomó 1 ml con una pipeta y se colocó en otro tubo de ensayo que tenía previamente 9 ml de agua estéril. Siendo esto la dilución 10^{-1} v/v. De la misma manera se hicieron las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} v/v, tomando como suspensión a extraer 1 ml de la anteriormente realizada (método de diluciones seriadas).

De la suspensión correspondiente a la dilución 10^{-3} , se extrajo con una micropipeta 50 μ l, previa agitación del tubo de ensayo en agitador de tipo vortex, y se determinó la concentración de conidios con una cámara de Neubauer (Fig. N°7) a través de la observación en microscopio óptico, y de acuerdo al protocolo de lectura utilizado en CeTBio, el cual consistió en realizar las lecturas en forma diagonal (Figura N°8).

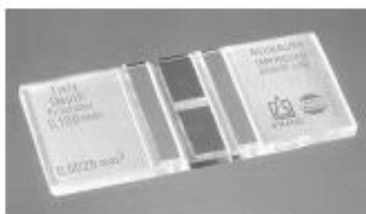


Fig. N° 7: (A) cámara de Neubauer, Extraído de Caballero, W.A., Senés, P. J., Toumanián, A. G, 2016.

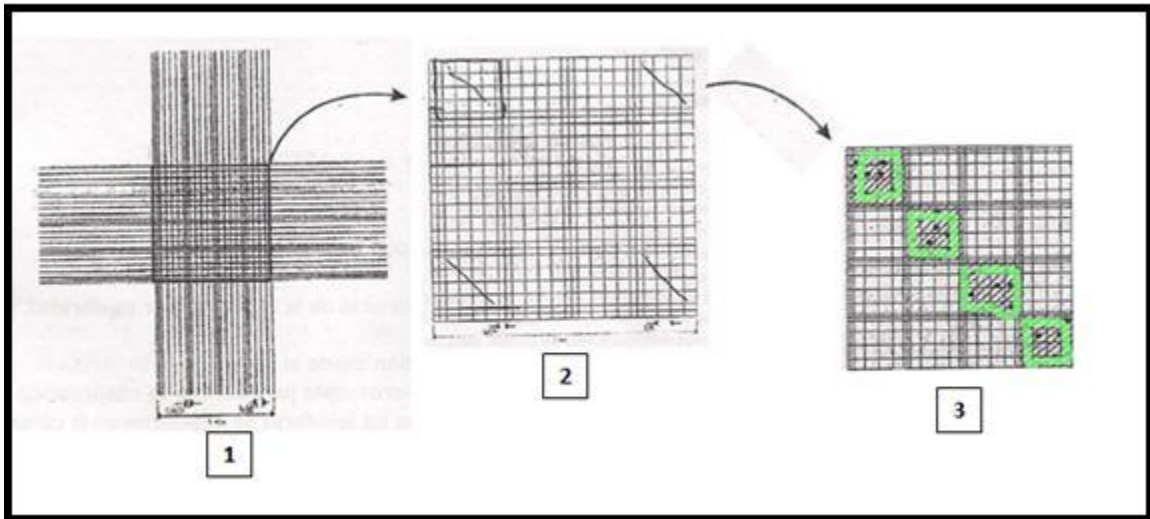


Fig. Nº 8: Cámara de recuento de Neubauer. 1) vista general de la cámara. 2) cuadrantes para el conteo. 3) descripción del recuento en diagonal. Extraído de Caballero, W.A., Senés, P. J., Toumanián, A. G, 2016.

La ecuación de conteo de esporas utilizada según el protocolo de trabajo fue la siguiente:

$$\frac{X \text{ esporas contadas}}{Y \text{ cuadros}} \times \frac{\# \text{ cuadros cámara}}{\text{volumen cámara}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} = \text{UFC/ml}$$

Dónde: X es el número promedio de esporas contadas, es decir el total contado dividido 4

Y es el número de cuadros, en nuestro caso 16

cuadros cámara es igual a un valor constante de 400 cuadros

Volumen de cámara corresponde a un valor de 0.1 mm³

- **Porcentaje de germinación o viabilidad.**

Con éste se determinó el porcentaje de conidios típicos que están en condiciones de germinar en un período de tiempo determinado, después de ser sembrado en medio de cultivo APG.

Se tomó 0,2ml de la dilución 10⁻³ y se sembró en placas de Petri con APG, incubó durante 12 horas. (Anexo- Fig. Nº 27)

Luego en la cámara de flujo laminar con un asa, se cortó una porción de agar de más o menos 1 cm² y se colocó sobre un porta objeto, se agregó una gota de colorante, azul de lactofenol, se cubrió con el cubreobjeto. Se sacó de esta manera 5 muestras por placa, se llevó al microscopio y realizó el recuento de conidios germinados y no germinados, contando como mínimo 200 conidios por cada muestra.

Se registró los datos, se sacó el promedio de las 5 lecturas y se calculó el porcentaje de conidios germinados y no germinados, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{a}{a + b} \cdot 100$$

a = número de conidios germinados

b = número de conidios sin germinar

Resultados igual o superior al 90 % se consideró que la viabilidad del producto como adecuado.

▪ Pureza

Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-11} , se sembró 0.2 ml de la última dilución en placas con medio de cultivo APG, tres placas, se incubaron durante cinco días a temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Se evaluó y sacó el promedio del número de unidades formadoras de colonias UFC de los contaminantes y el número de UFC del hongo evaluado. Se multiplicó por la inversa de la dilución y el volumen empleado.

Se aplicó los datos obtenidos a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Pureza} = \frac{\text{UFC he}}{\text{UFC t}} \cdot 100$$

UFC he = Unidades Formadoras de Colonias del hongo evaluado

UFC t= Unidades Formadoras de Colonias totales

Se determinó si el producto final era puro o contenía contaminantes. Contribuyendo a mejorar el proceso de producción y formulación de los entomopatógenos.

3. Ensayos in vitro sobre *Tenebrio molitor* (Tenebrios).

Estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC. Se utilizaron insectos criados en el laboratorio, por su facilidad de manejo y crianza.

Los ensayos in vitro, se realizaron mediante dos métodos, uno asperjando los insectos con una suspensión de esporas de una concentración conocida y el segundo sumergiendo los insectos en la suspensión de esporas.

Luego se colocó a los insectos en frascos con alimento previamente autoclavado, se los acondicionó en una cámara de cría a temperatura $25 \pm 1^\circ \text{C}$ y se los revisó diariamente retirando los insectos que mostraban síntomas de infección. Una vez muertos, se esterilizaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril, se los puso sobre un papel toalla estéril para eliminar el exceso de humedad y se colocaron en una placa Petri con APG. (Anexo-Fig. N° 28).

4. Ensayo in vivo sobre el complejo de orugas defoliadoras

4.1. En invernadero

En cuanto a las orugas defoliadoras, se recolectaron en el campo escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y se colocaron en macetas con plantas de soja, las que se mantuvieron en invernáculo. Las larvas fueron pulverizadas con Bb una vez colocadas sobre las plantas simulando una pulverización a campo. Los días siguientes se tomaron datos del comportamiento alimenticio de las mismas. Una vez muertas se las desinfecto con hipoclorito retirando el residuo del desinfectante con agua destilada esterilizada, luego se las colocó en caja Petri con APG+ antibiótico (Fig. N° 9), con la finalidad de controlar la proliferación de bacterias saprofitas que puedan tener las larvas.

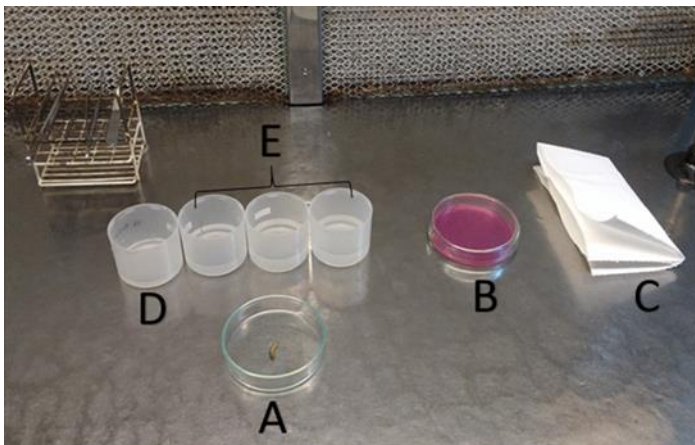


Fig. N° 9: (A) *Spodoptera frugiperda* infectada con *Beauveria bassiana*, (B) placa petri con APG+antibiótico, (C) papel para secar las larvas, (D) hipoclorito al 1%, (E) agua destilada esterilizada.

4.2. A campo

El ensayo se llevó a cabo en el Campo Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias durante la campaña agrícola 2019-2020.

La siembra del cultivo de soja se realizó el 6 de diciembre del 2019 y el ensayo contó con una superficie de 32 ha. (*Beauveria bassiana* + testigo 0,05 ha y Clorantraniliprol 31,95 ha).

El ensayo estuvo compuesto por tres tratamientos: 1) Clorantraniliprol 20%; 2) *Beauveria bassiana* y 3) testigo absoluto (sin aplicación de insecticidas). (Fig. N° 10). El clorantraniliprol se aplicó con una pulverizadora autopropulsada, mientras que Bb y el agua del testigo fue con mochila a CO₂.

La única aplicación con clorantraniliprol fue el 19 de enero, la dosis utilizada fue de 50 cc/ha, mientras que la aplicación de Bb se realizó el 24 de enero y se repitió cada 15 días haciendo un total de tres aplicaciones en el ciclo del cultivo, utilizando 4 l/ha. a una concentración de 1×10^9 conidios/ml, excepto en la repetición B4, donde la dosis fue de 8 l/ha con la finalidad de comprobar eficiencia de acción del hongo a dosis mayores. En las repeticiones del testigo, se aplicó 4 l/ha de agua. El estadio fenológico del cultivo al momento de la única aplicación del clorantraniliprol y de la primera dosis de Bb fue R1.

Como variables respuesta se midieron, porcentaje de defoliación, número de orugas defoliadoras por metro y orugas parasitadas ya sea por *Beauveria bassiana* como por otros microorganismos u organismos entomopatógenos.

En cuanto a los muestreos se hicieron antes de la aplicación, para tener la información base y posterior a la aplicación cada 15 días hasta madurez fisiológica del cultivo.

Muestreos.

Se tomaron 9 muestras con paño vertical en cada parcela, discriminando por insecto, tamaño y grado de parasitismo. Para los insectos benéficos voladores se hizo un paneo general, verificando la presencia de algunas especies de importancia en el control biológico, como por ejemplo familia *Tachinidae* y micro *Himenópteros*.

Para el monitoreo de los daños de defoliadoras, se utilizó un patrón de defoliación del E.E.A. Pergamino (Anexo- Fig. N° 29) a fin de determinar el grado de defoliación que presenta el lote. Se tomaron 27 muestras al azar (9 en la parcela Clorantraniliprol, que se encuentra rodeando a los otros tratamientos, 9 en la parcela con Bb y 9 en la parcela testigo) Cada muestra formada por 15 folíolos, se recolectaron sectorizadas y no de plantas individuales. Se tomaron al azar 5 folíolos del tercio superior, 5 folíolos del tercio medio y 5 folíolos del tercio inferior, se midió cada folíolo comparativamente con dicho patrón para finalmente sacar un promedio de defoliación en las parcelas.

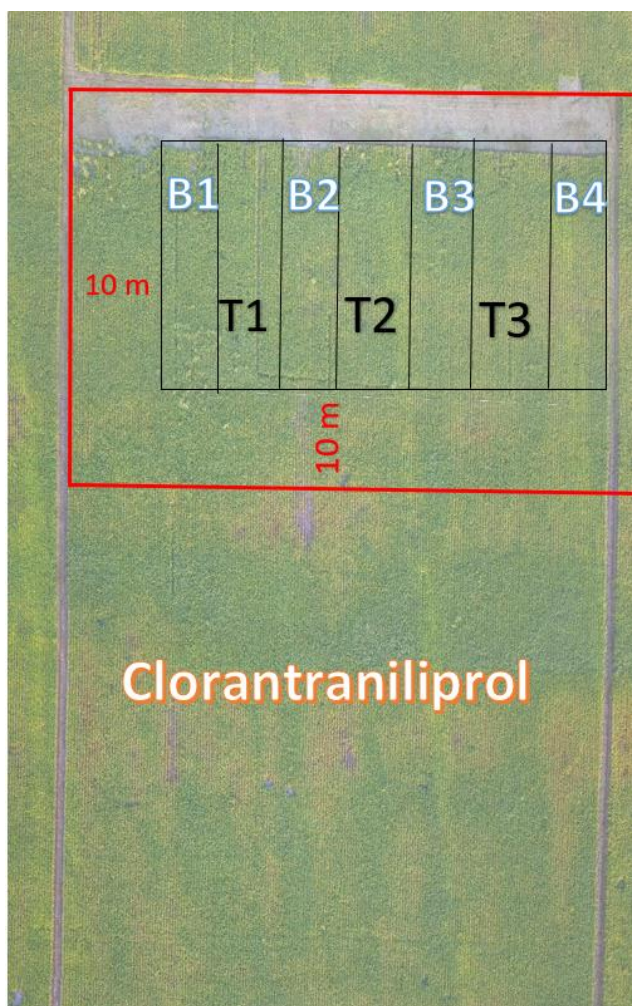


Fig. Nº 10: Esquema de aplicación foliar, donde B1, B2, B3 y B4 son las repeticiones del tratamiento con *Beauveria Bassiana*, T1, T2 y T3 son las repeticiones del Testigo y Clorantraniliprol rodeando a los demás tratamientos con una bordura 10 m.

A modo general se comparó Clorantraniliprol vs. testigo por un lado y Bb vs testigo por otro, ya que el tiempo de acción de ambos tratamientos fue diferente (Bb fue aplicado 5 días después del Clorantraniliprol).

Se ajustaron modelos lineales generalizados (GLM) para el análisis de los efectos del tratamiento. La variable % de defoliación se analizó considerándola como “quasibinomial”.

La significancia del efecto del tratamiento se evaluó mediante el test de chi-squared para la diferencia de devianzas (análogo a varianza, pero en GLM). El número de orugas normales o bien parasitadas se analizó considerando distribución Poisson (conteos: números enteros mayores o iguales a 0).

Gráficos y ajustes de modelos se realizaron con el software estadístico R (R Core Team, 2021).

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de la calidad: Recuento de esporas, porcentaje de germinación o viabilidad y pureza.

Los resultados arrojados por el método de dilución seriada con recuento de esporas en cámara de Neubauer y siembra en placa de Petri en medio Agar Papa Glucosado (APG) arrojaron en todas las formulaciones una concentración de 1×10^9 conidios por mililitro. El porcentaje de conidios germinados en medio de cultivo en cada una de las formulaciones que se realizaron, mostró una viabilidad superior al 90 %. No se encontraron contaminantes fúngicos ni bacterianos.

Ensayos in vitro sobre *Tenebrio molitor*.

En cuanto a los ensayos in vitro sobre *Tenebrios*, se pudo comprobar una disminución en la alimentación a las 72 hs. de inoculados y a las 80 hs. perdieron totalmente la movilidad.

En la Fig. N° 11 representa las 96 hs, se observa como el micelio de Bb emerge por las articulaciones para luego esporular a las 120 hs. (Fig. N° 12) y seguir el ciclo de infección ya que es un hongo muy patogénico, es policíclico, genera varios ciclos de infección en un ciclo de cultivo. Pudiendo alternar fases parasíticas (insectos) y saprofiticas (medio en el que se encuentre).

Pasadas las 192 hs, se pudo observar el gran desarrollo de Bb sobre el insecto y la placa Petri, como lo muestra la Fig. N° 13, sin desarrollo de otros contaminantes, un aspecto "momificado" quedando envueltas por un moho algodonoso de color blanco puro que termina por cubrirse de una abundante eflorescencia de aspecto pulverulento, semejante al yeso molido, como lo describe Marchionatto, J. (1932).



Fig. N° 11: Micelio *Beauveria bassiana* emergiendo por las articulaciones.

Fig. N° 12: Esporulación de *Beauveria bassiana*.



Fig. N° 13: (A) método de asperjado y (B) método de sumergido

Ensayo in vivo sobre el complejo de orugas defoliadoras.

En Invernadero

En relación al ensayo llevado a cabo sobre orugas defoliadoras en invernadero (Fig. N° 14), se pudo observar que el cese de alimentación fue a partir de las 96 hs. de inoculadas y a las 120 hs. las larvas se encontraban totalmente quietas fuera de la planta (Fig. N° 15). Una vez colocadas en caja de Petri, al cabo de 48 hs, se observó la colonización de micelio blanco, perteneciente al género *Rhizopus* y a las 72 hs se pudo visualizar la emergencia de micelio perteneciente a Bb. (Fig. N° 16). Bacca, T. y Lagos, C. (2014) indican que existe una competencia intraespecífica de los organismos involucrados en esta relación, existe desarrollo del hongo, pero la esporulación es más baja en comparación cuando se aplica solo *Beauveria bassiana*.



Fig. Nº 14: Pulverización con *Beauveria bassiana* en invernadero.



Fig. Nº 15: *Spodoptera frugiperda* infectada fuera de la planta.



Fig. Nº 16: (A) *Spodoptera frugiperda* cubierta por el saprofito *Rhizopus* sp. (B) micelio de *Beauveria bassiana*.

A campo

En cuanto a los muestreos de larvas con el paño vertical sobre las parcelas donde se aplicó Bb, no se recolectaron larvas afectadas, pero se observaron orugas momificadas sobre hojas y frutos, la mayor cantidad se detectó en el entre surco (Fig. Nº 17 y 18). Esto explicaría el resultado obtenido a laboratorio sobre orugas defoliadoras, que las larvas al estar infectadas por el hongo, no se mantienen en la parte aérea de la planta, sino que bajan al suelo.

Es importante mencionar que además de las larvas parasitadas por el entomopatógeno en estudio, se encontraron en el lote, larvas de *Anticarsia*

gemmatalis parasitada con *Metarhizium* sp y de *Rachiplusia nu* parasitadas con especies de la familia *Tachinidae* y *Eulophidae* (ectoparásito). (Fig. N° 19 y 20).



Fig. N° 17: Larva momificada por *Beauveria bassiana*.



Fig. N° 18: Larvas momificadas por *Beauveria bassiana*, ubicadas en el entre surco.



Fig. N° 19: *Rachiplusia nu* afectada por un ectoparásito de la familia *Eulophidae*.



Fig. N° 20: *Anticarsia gemmatalis* momificada por *Metarhizium* sp..

En la fig. N° 21, se observó que a partir de la aplicación de Clorantraniliprol hubo una disminución marcada de la población y a partir de los 31 días demuestra para los diferentes tratamientos un incremento en el número de larvas y en mayor proporción larvas chicas (<1,5 cm).

A partir del análisis estadístico se observó que solo hubo diferencias significativas en el número de *R.nu* debido al tratamiento insecticida ($P=0.007$). Se observaron menos orugas chicas debido a la aplicación de Clorantraniliprol a los 31 días. Si bien la media observada para el número de *R.nu* fue menor en el tratamiento Bb, estas diferencias no fueron significativas ($P < 0.05$). (Ver anexo-análisis de datos estadísticos).

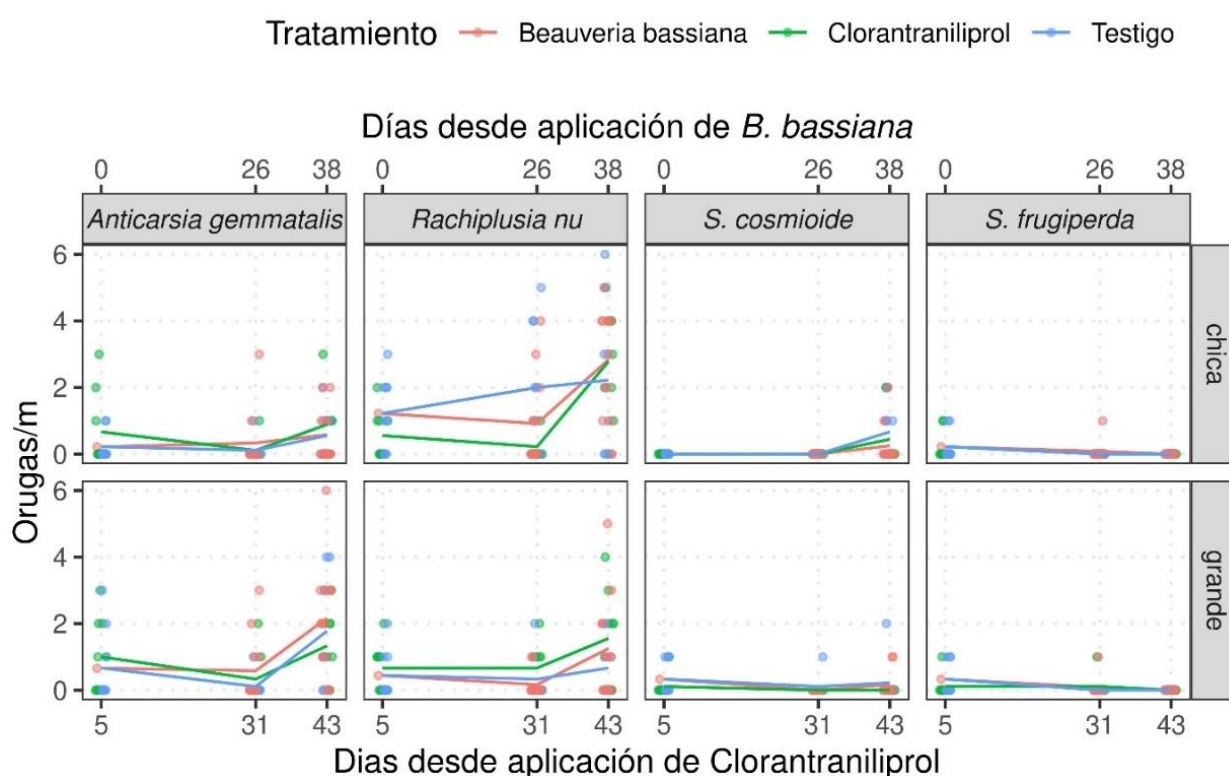


Fig. N° 21: orugas recolectadas por metro, donde los puntos de colores representan los datos recolectados en cada muestra para cada tratamiento, y las líneas de colores son las medias.

En la fig. N° 22, se observa en Bb y testigo, para larvas chicas, un mayor número de larvas parasitadas, esto indicaría que hubo mas actividad de los insectos parasitoides en estos tratamientos en comparación a la parcela de Clorantraniliprol. Si bien se mostró esa tendencia no está relacionado al diseño del ensayo y tampoco se ha demostrado que el principio activo de clorantraniliprol tenga efecto repelente.

A partir del análisis estadístico hubo diferencias significativas a favor del testigo vs Clorantraniliprol para el número de *R.nu* parasitadas por insectos a los 5 y 43 días ($P=0.009$).

A los 26 días desde aplicado Bb hubo mayor número de *R. nu* parasitada 0,17 vs 0 en el testigo. Se revierte a los 38 días, siendo mayor en el testigo 0,33 vs 0,16 en el tratamiento Bb. (Ver anexo- análisis de datos estadísticos)

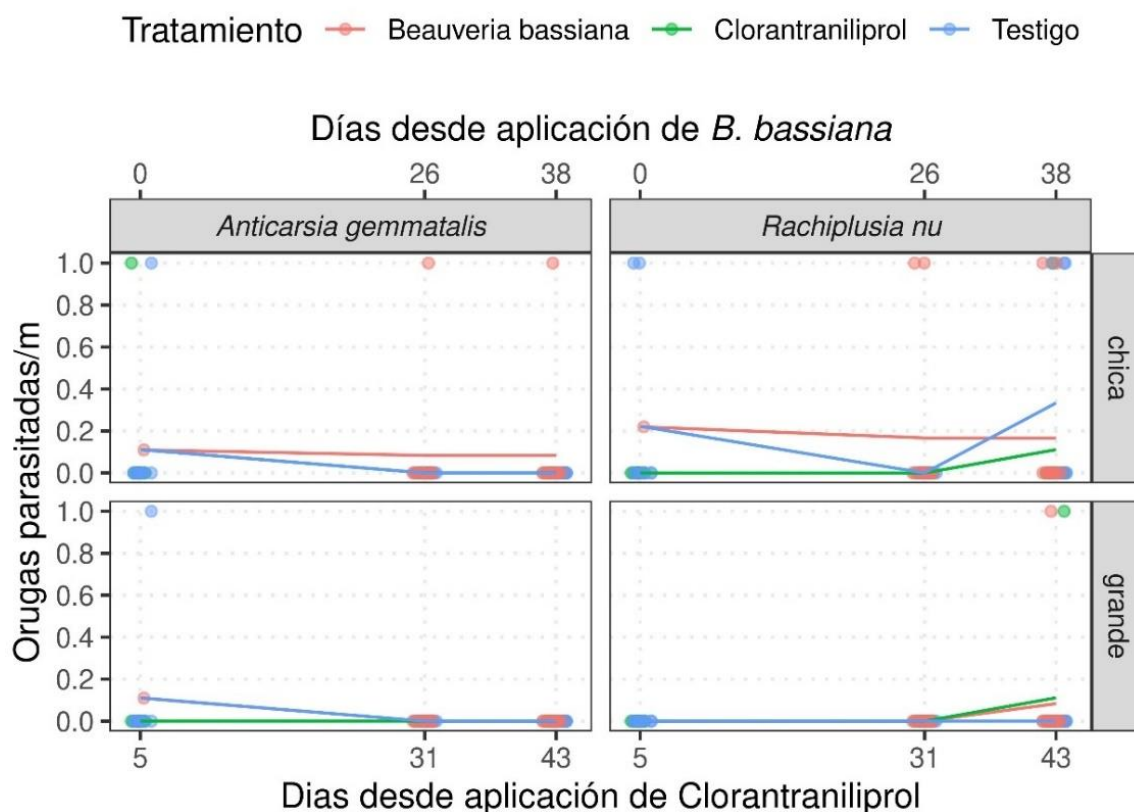


Fig. Nº 22: orugas parasitadas por insectos, donde los puntos de colores indican los datos recolectados en cada muestreo para cada tratamiento.

Medición del efecto de *Beauveria bassiana* en el porcentaje de defoliación.

El muestreo previo realizado en las parcelas de los tratamientos Clorantraniliprol y testigo arrojaron los resultados que se observan en la tabla 1. Los porcentajes de defoliación para todas las fechas de muestreo, fueron muy similares a pesar que desde el tratamiento Clorantraniliprol hasta el primer relevamiento de datos pasaron 5 días, esto se puede deber a que la franja de 10 metros entre Clorantraniliprol y el testigo, no fue una barrera efectiva pudiendo llegar el producto de síntesis química a la parcela sin aplicación. Por otro lado, también puede deberse a una disminución de su población de larvas grandes (que causan mayor daño) para empupar y dar lugar a una nueva generación (ciclo natural), al haber larvas menores a 1,5 cm, disminuyendo la presión de defoliación.

Tabla 1: Cuadro Resumen del porcentaje de defoliación promedio de los diferentes tratamientos.

	24/01/20	19/02/20	02/03/20
Clorantraniliprol	11%	8%	5,6%
Testigo	10%	4,5%	7%
Beauveria (B)		6%	6,2%

En la figura N° 23, se observó luego de la aplicación del insecticida de síntesis química una disminución marcada en la defoliación para los tres tratamientos. En cambio, a los 31 días de haber aplicado el clorantraniliprol, hay una disminución abrupta de la defoliación y no así en el testigo y Bb donde se observó un pequeño incremento de defoliación.

No hubo diferencias significativas en el % de defoliación debido a la aplicación de ($P=0.063$).

B. bassiana solo se comparó con el testigo ya que él tuvo más tiempo de acción. Tampoco hubo diferencia en la defoliación debido a la aplicación de Bb respecto al testigo sin tratar ($P=0.5881$). (Ver anexo- análisis de datos estadísticos)

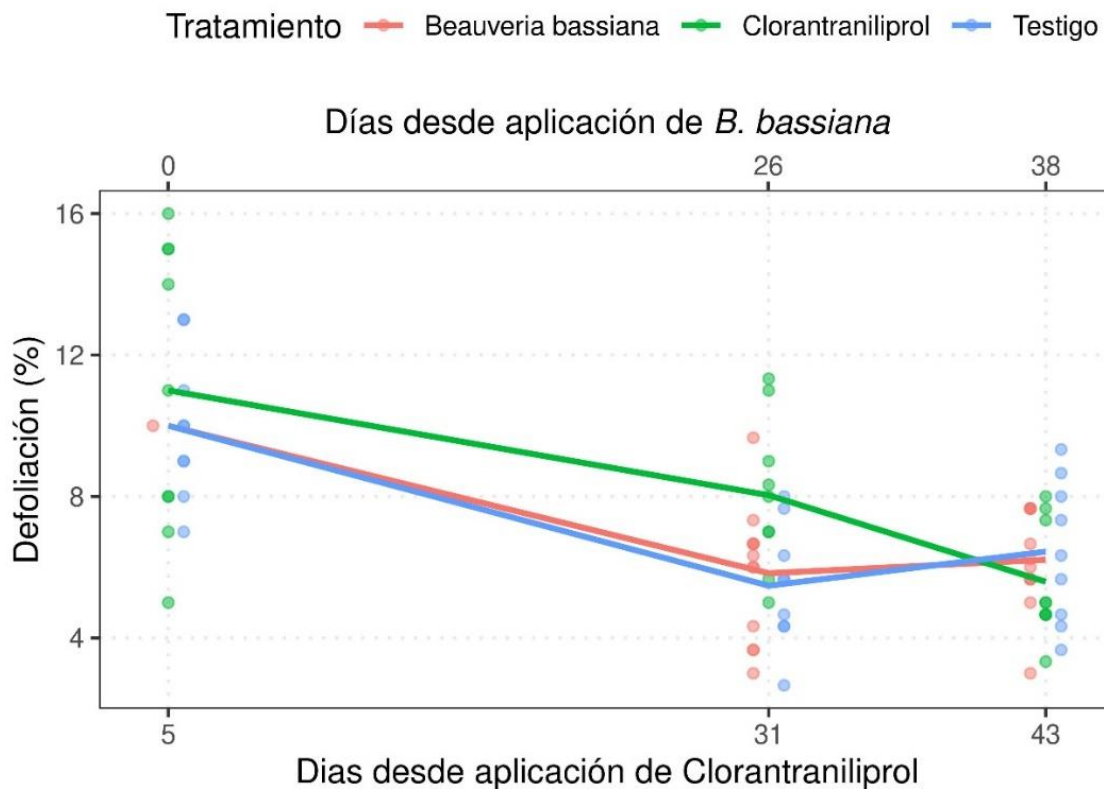


Fig. N° 23: Porcentaje de defoliación, donde los puntos de colores representan los datos recolectados para cada tratamiento y las líneas representan las medias.

CONCLUSIONES:

La multiplicación masiva de *Beauveria bassiana*, se logró multiplicar con bajo costo y alta calidad dicho entomopatógeno, llegando a valores de 1×10^9 conidios ml^{-1} , con una pureza del 100% y una viabilidad superior al 90%.

Al realizar los ensayos in vitro sobre los tenebrios se pudo comprobar la acción insecticida de *Beauveria bassiana* mostrando que a partir de las 72h. ya habría control de los insectos en estudio.

Respecto a los ensayos in vivo sobre el complejo de orugas defoliadoras se pudo verificar la acción insecticida, ya que se encontraron en las parcelas de Bb, orugas momificadas por *Beauveria bassiana*. Por otro lado, podría sugerirse que al estar infectada por el hongo bajan de la planta y permanecen en el suelo.

En relación a los enemigos naturales no se encontró ningún insecto afectado por las aplicaciones de *Beauveria bassiana*.

En cuanto al monitoreo de defoliación, se determinó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, ya que a partir de la aplicación de clorantraniliprol hubo una marcada disminución en el porcentaje de defoliación, podría sugerirse que estuvo relacionado con la deriva del insecticida de síntesis química. Si bien en los sucesivos muestreos se observó una disminución en el porcentaje esto no está relacionado con el efecto repelente del producto de síntesis química, debido a que los adultos de las defoliadoras pueden desplazarse a más de 1000 metros, por lo que se descarta el efecto bordura en los tratamientos (Bb y testigo), pudiendo estar relacionados a la no preferencia de los insectos a ese lote.

Si bien, es necesario profundizar en la investigación en el uso de *Beauveria bassiana*, se concluye que la aplicación del hongo entomopatógeno en estudio sobre los insectos plagas, permite reducir la aplicación de productos de síntesis química, como lo hemos observado en los ensayos llevado a cabo a laboratorio. Es necesario mejorar el diseño de ensayo a campo para trasladar mejor los resultados de laboratorio a campo.

A medida que fuimos desarrollando este trabajo, nos fuimos formando tanto en lo personal como en lo profesional. Esta experiencia nos permitió interactuar con zoólogos, fitopatólogos, estadísticos, amigos y compañeros, aprender de cada uno de ellos, desarrollar una metodología de trabajo, la capacidad de comunicación y conocer la rama de la investigación, la cual pretendo seguir como profesional en esta línea de trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Publicaciones y artículos citados y consultados

- 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 Microbióloga Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.* 107 p.
- Allendes G., 2007. Evaluación de ocho cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) sorokin., para el control de *Aleurothrixus floccosus* Maskell. *Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad Agrónoma.*
- Altieri, M., Nicholls, C. 2007. Conversión agroecológica de sistemas convencionales de producción: teoría, estrategias y evaluación. *Ecosistemas*, 16(1). <https://doi.org/10.7818/ECOS.133>
- Bacca, T., Lagos Burbano, T., 2014. Efecto de *Beauveria bassiana* y del entomonematodo *Steinernema* sp. sobre larvas de *Galleria mellonella*. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural.* 18. 247-258.
- Blann K.L., Anderson J.L., Sands G.R., Vondracek, B., 2009. Efectos del drenaje agrícola en los ecosistemas acuáticos: una revisión. *Revisiones críticas en ciencia y tecnología ambientales* 39: 909-1001.
- Bustillo, A., 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. *En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá, pp.* 30–53.
- Cañedo, V., Ames, T., 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. *Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú,* 62 pp.
- Caballero, W.A., Senés, P. J., Toumanián, A. G., 2016. Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma atroviride* en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Trabajo final de Área de Consolidación. FCA-UNC. Disponible en: Caballero - Senés - Toumanián - Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma*....pdf (unc.edu.ar). Consultado el 13/04/21
- Casafe, 2011. Mercado argentino de productos fitosanitarios 2010. *Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires.* <http://www.casafe.org/estad/Mercado2010.htm>.
- Charnley, A., Collins, S. 2007. Hongos entomopatógenos y su papel en el control de plagas. *En: Kubicek, C.P., I.S. Druzhinina (eds.), Relación ambiental y microbiana. La Mycota IV Springer – Verlag Belin Heidelberg.* pp. 159–187.
- Dotti de Araujo, V., 2019. Actualización de las estrategias de control y nuevas propuestas de bajo impacto ambiental para el manejo de orugas defoliadoras en el cultivo de soja (*Glycine max* L.). *RI-UNLZ.* Disponible en: <http://repositorio.unlz.edu.ar:8080//handle/123456789/469>.
- Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. 2001. Sugerencias para unificar la terminología en control biológico. *BioControl* 46:387–400. doi: 10.1023/A:1014193329979.
- Foley J.A., Ramankutty N., Brauman K.A., Cassidy E.S., Gerber J.S., Johnston M., Mueller N.D., O’Connell C., Ray D.K., West P.C., Balzer C., Bennett E.M., Carpenter S.R., Hill J., Monfreda C., Polasky S., Rockstrom J., Sheehan J., Siebert S., Tilman D., Zaks D.P.M., 2011. Soluciones para un planeta cultivado. *Naturaleza* 478: 337-342.

Iannone, N., 2012. Umbrales, defoliación y otros aspectos a considerar para la toma de decisión de control de defoladoras. *Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino, Pergamino, Buenos Aires.*

Letourneau, D., Armbrrecht, I., Salguero, B., Montoya-Lerma, J., Jiménez, E., Daza, M., Escobar, S., Galindo, V., Gutierrez-Chacón, C., López, S., López Mejía, J., Acosta Rangel, A., Rangel, J., Rivera-Pedroza, L., Saavedra-Rodríguez, C., Torres, A., Reyes, A. 2011. ¿La diversidad vegetal beneficia a los agroecosistemas? Una revisión sintética. *Aplicaciones ecológicas: una publicación de la Sociedad Ecológica de America*. 21. 9-21. 10.2307/29779633.

Marchionatto, J., 1932. Un interesante hongo Entomógeno (*Beauveria globulifera* (Speg.) Picard. *Revista de la Facultad de Agronomía, UNLP. ISSN 0041-8676, ISSN-e 1669-9513, Vol. 20, Nº. 1, 1934, págs. 13-18.*

Monzón, A., 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. *Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica*. 63: 95-103.

Nastis, S., Michailidis, Anastasios, Mattas, Konstadinos. 2013. Repercusiones en la biodiversidad de cultivos de la agricultura ecológica subvencionada. *Política de uso de la tierra*. 32. 23-26. 10.1016/j.landusepol.2012.09.012.

Pascale, A. J. 1989. Evolución del cultivo de la soja en la Argentina. *Revista de la asociación argentina de la soja. Vol IX (1-2): 9-17.*

Pedrini, N., Crespo, M., Juárez, 2007. Bioquímica de la degradación de la epicutícula de insectos por hongos entomopatógenos. *Bioquímica y fisiología comparativas, Parte C*, 146:124–137.

Piquin, A. 1968. Soja: cultivo del futuro argentino. *Revista Bolsa de Cereales* 2811: 38-43.

Relyea, R.A., 2005. El impacto de insecticidas y herbicidas en la biodiversidad y productividad de las comunidades acuáticas. *Aplicaciones Ecológicas* 15: 618-627.

Rifkin J., 2011. La tercera revolución industrial: cómo el poder lateral está transformando la energía, la economía y el mundo. *Palgrave Macmillan, EEUU.*

Rodríguez, M., Gerding, M. y France, A., 2006. Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidóptera: Gelechiidae). *Agricultura técnica (Chile)*. 66 (2):151-158.

Salvador, R., 2010. Caracterización biológica y molecular de genes involucrados en la virulencia de baculovirus de importancia agronómica. *IBBM, UNLP–Conicet, La Plata.*

Scholte, E., Knols B., Samson, R., Takken W., 2004. Hongos entomopatógenos para el control de mosquitos: una revisión, *diario de la ciencia de los insectos* 1, 19. *Volumen 4, Número 1, 19, <https://doi.org/10.1093/jis/4.1.19>*

Sparks T., Nauen R., 2015. IRAC: Clasificación del modo de acción y manejo de la resistencia a los insecticidas. *Bioquímica y fisiología de plaguicidas* 121: 122- 128.

Tanada, Y. & Kaya, H. 1993. Patología de insectos. *Prensa académica. San Diego, California (USA).*

Valenzuela, E. 1987. Microorganismos entomopatógenos su aprovechamiento en el control de insectos plagas. *Universidad Autónoma de Chapingo.*

Villaamil Lepori E., Bovi Mitre G., Nassetta M., 2013. Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29: 25-43.

Ybran, R., Lacelli, G., 2016. Informe estadístico mercado de la soja. *INTA, E.E.A. Reconquista.*

Zarrili A., 2008. El proceso de agriculturización en las regiones extra pampeanas argentinas: insostenibilidad y límites de un modelo de transformación. La provincia del Chaco (1980-2006). *XII Congreso de Historia Agraria Argentina, 13-15 de marzo, Córdoba, Argentina.*

Zeni, E. R. 1971. El cultivo sagrado. *Revista Bolsa de Cereales* 2845: 3-7.

Sitios web

Bermudez, J., Simonazzi, A., Baldiviezo, V., Virgili, V., Herrera C., Arnal, P., Gentile A., Cardozo, R., 2015. Evaluación de formulaciones oleosas de *Beauveria bassiana* utilizando Poloxamer 407 para el desarrollo de un potente bioinsecticida contra el vector de la enfermedad de Chagas. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/294089509_Evaluacion_de_formulaciones_oleosas_de_Beauveria_bassiana_utilizando_Poloxamer_407_para_el_desarrollo_de_un_potente_bioinsecticida_contra_el_vector_de_la_enfermedad_de_Chagas.

Ultima revisión: enero 20, 2021.

Téllez–Jurado, A., Cruz Ramírez M., Mercado Flores, Y., Torres, A., Arana Cuenca, A., 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000200007. Ultima revisión: enero 15, 2021.

Zhang, Y., s.f. Insectos infección *beauveria bassiana*, zombi en las plantas en la naturaleza. Figura N°3. Disponible en https://es.123rf.com/photo_25862798_infection-beauveria-bassiana-insects-zombie-on-plants-in-the-wild.html. Ultima revisión: enero 20, 2021.

ANEXO

Producción de *Beauveria bassiana*.

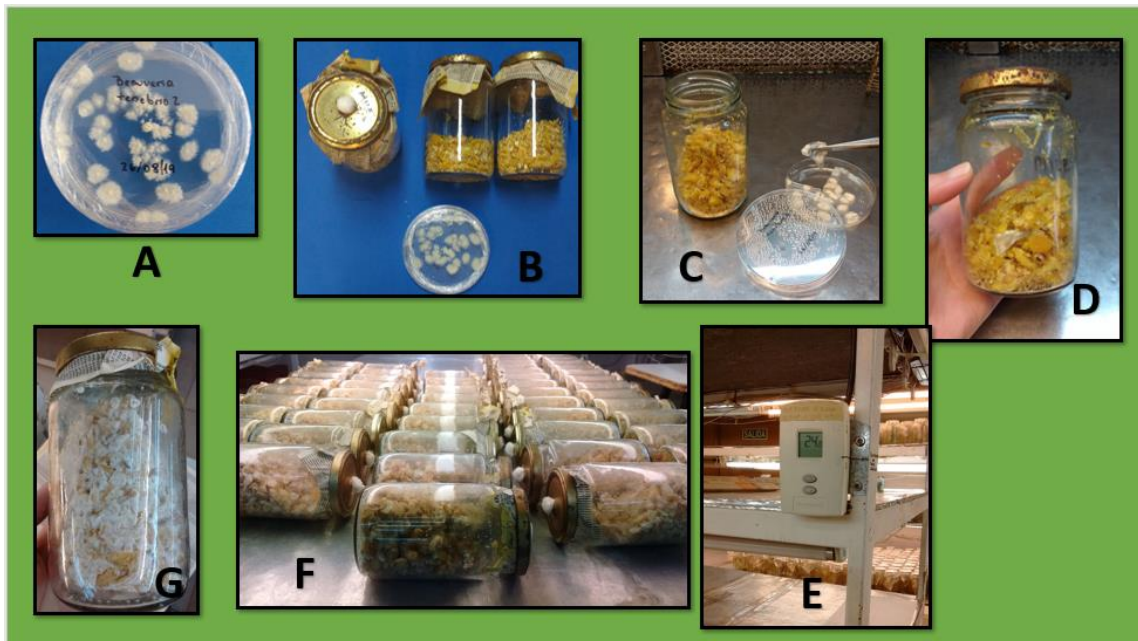


Fig. Nº 24: (A) Placa de Petri con *Beauveria bassiana*. (B) Sustrato en base de maíz triturado. (C.D) Inoculación del sustrato con *Beauveria bassiana*. (E) Termómetro en cámara de cría 24°-25°C. (F) Cámara de producción de *Beauveria bassiana*. (G) Sustrato totalmente cubierto por *Beauveria bassiana*.

Formulación de *Beauveria bassiana*



Fig. Nº 25: (A) Sustrato a base de maíz cubierto de micelio y esporas de *Beauveria bassiana*. (B) Elemento necesarios para la formulación. (C) Fricción y estrujado del sustrato de maíz+hongo. (D) Filtrado con granulometría mayor. (E) Suspensión lista para el 2do filtrado. (F) Filtrado de granulometría fina. (G) Llenado de los bidones. (H) *Beauveria Bassiana* en bidón de 5 L.

Determinación de la calidad de *Beauveria bassiana*

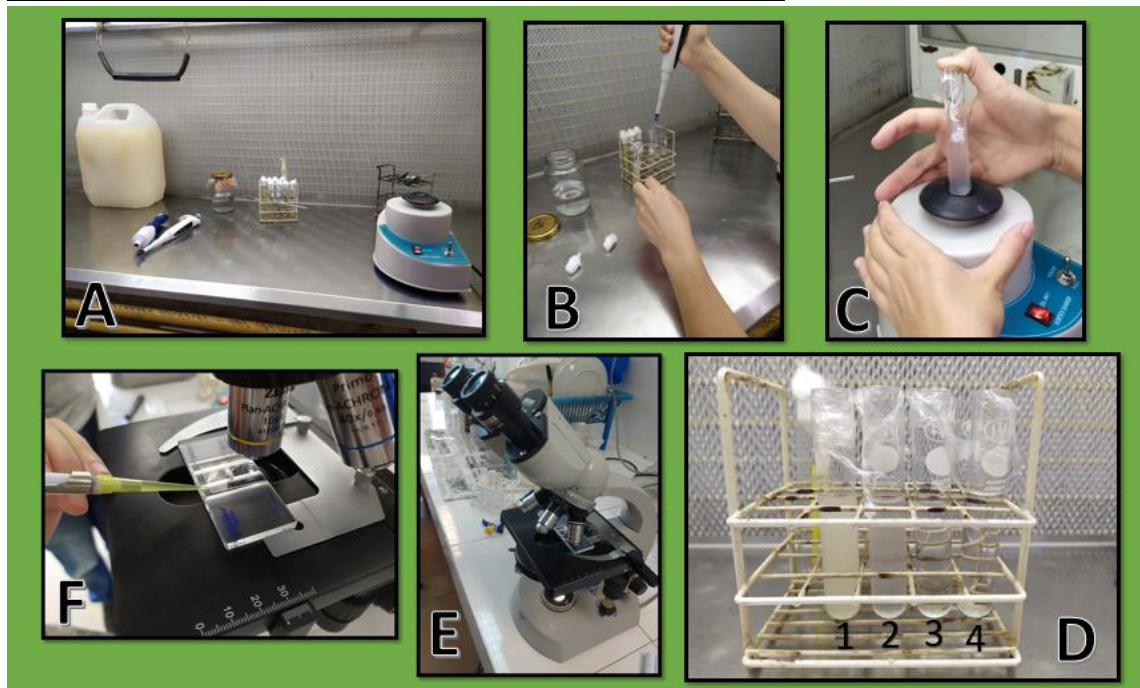


Fig. Nº 26: Recuento de esporas mediante el método de dilución seriada y recuento de esporas en cámara de Neubauer. (A) Elemento para la dilución y el recuento de esporas. (B) dilución de la madre (C) agitado en agitador tipo Vórtex (D) 1. Solución madre 10ml. 2. Dilución 10⁻¹ 3. Dilución 10⁻². 4. Dilución 10⁻³. (E) Lectura con microscopio óptico. (F) Cámara Neubauer.

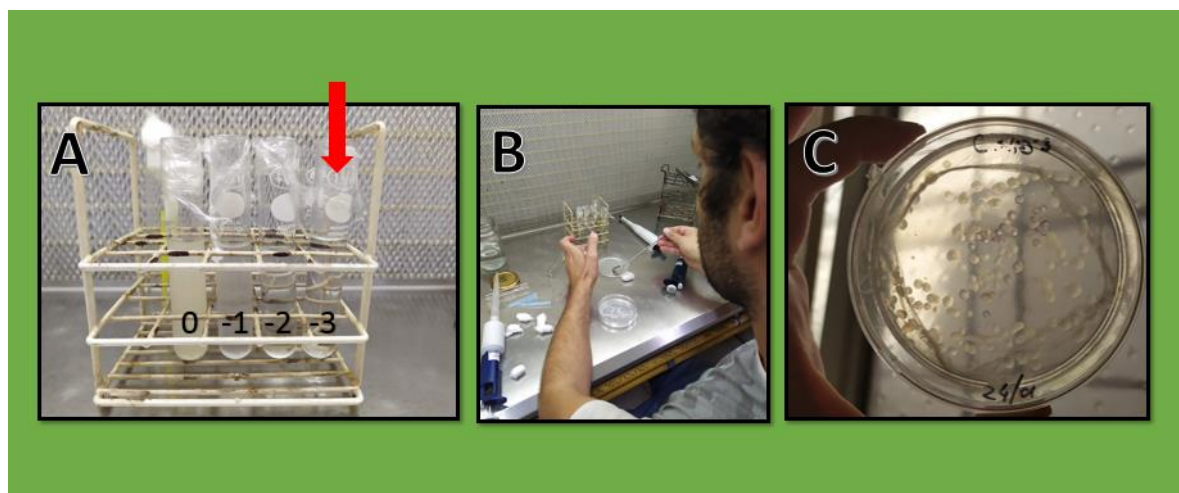


Fig. Nº 27: Porcentaje de germinación o viabilidad. (A) 1. Solución madre 10ml. 2. Dilución 10⁻¹ 3. Dilución 10⁻². 4. Dilución 10⁻³ (B) Estriado en placa Petri (C) Colonias de *Beauveria bassiana* puras.

Ensayos in vitro sobre *Tenebrios molitor* (*Tenebrios*).

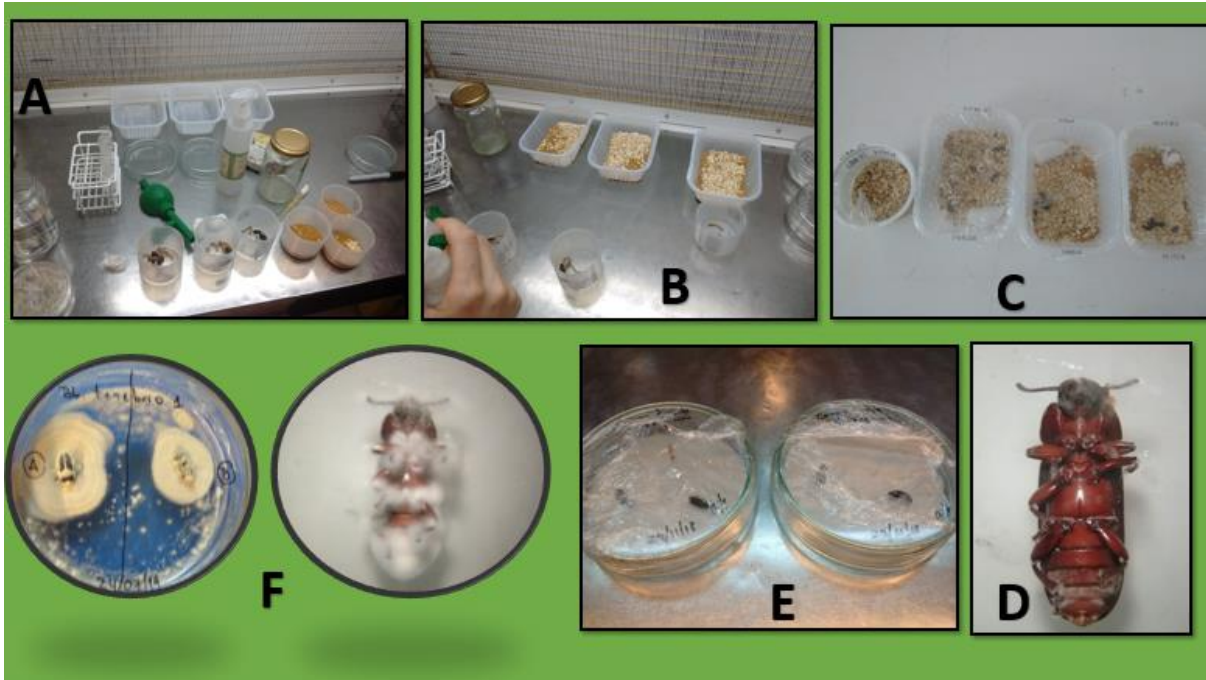


Fig. Nº 28: (A) Elementos a utilizar en la inoculación. (B) Alimento y *Tenebrios* esterilizados. (C) Insectos asperjados y sumergidos en la solución de esporas conocidas, con sus testigos asperjados y sumergidos en agua. (D) *Tenebrio* momificado por *Beauveria bassiana* (E) Cámara húmeda. (F) Esporulación de *Beauveria bassiana* en los insectos momificados.

Monitoreo de los daños de defoliación

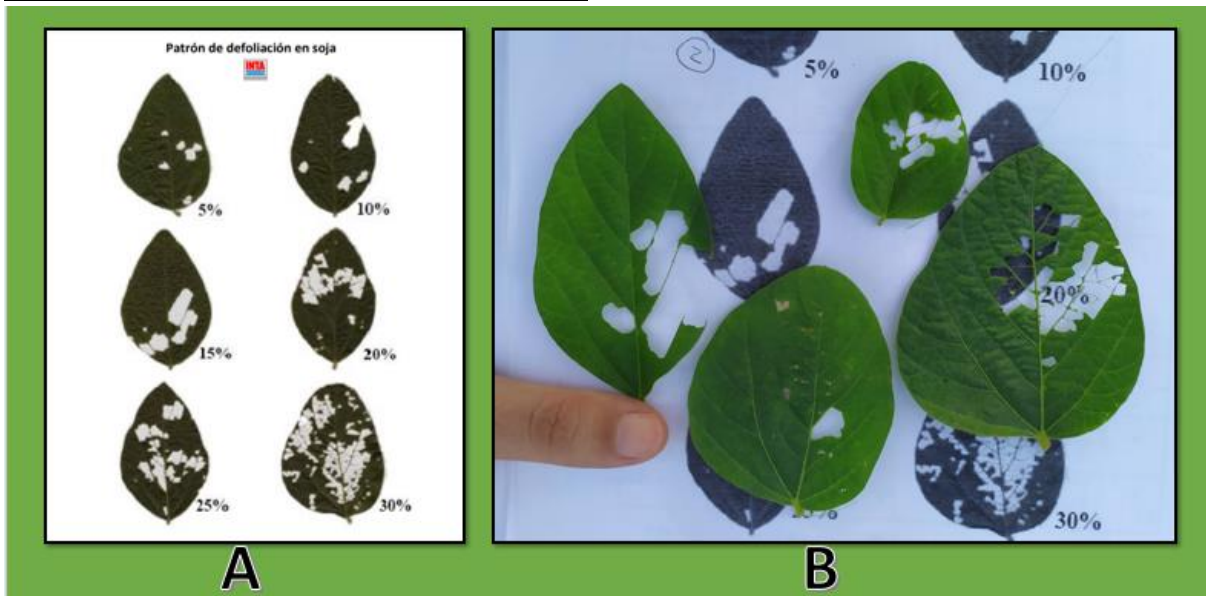


Fig. Nº 29: (A) Patrón de defoliación en soja. Extraído de Iannone, N. 2012 (E.E.A. Pergamino). (B) Comparación entre el patrón y los folíolos recolectados

ANEXO- Análisis de datos estadísticos.

Fig. Nº 23: Porcentaje de defoliacion.

```
## Analysis of Deviance Table
##
## Model: quasibinomial, link: logit
##
## Response: val/100
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##
##          Df Deviance Resid. Df Resid. Dev Pr(>Chi)
## NULL                    53   0.71259
## trat                    52   0.69721  0.15617
## factor(dias)            50   0.41669 1.084e-08 ***
## trat:factor(dias)       48   0.37456  0.06361 .
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

## dias = 5:
## trat          prob      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Clorantraniliprol 0.1100 0.00912 Inf   0.0934   0.1292
## Testigo          0.1000 0.00874 Inf   0.0841   0.1185
##
## dias = 31:
## trat          prob      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Clorantraniliprol 0.0804 0.00792 Inf   0.0661   0.0973
##
## Testigo          0.0548 0.00663 Inf   0.0431   0.0693
##
## dias = 43:
## trat          prob      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Clorantraniliprol 0.0559 0.00670 Inf   0.0441   0.0706
## Testigo          0.0644 0.00716 Inf   0.0517   0.0799
##
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the logit scale

## dias = 5:
## trat          prob      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Clorantraniliprol 0.1100 0.00912 Inf   0.0934   0.1292
## Testigo          0.1000 0.00874 Inf   0.0841   0.1185
##
## dias = 31:
## trat          prob      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Clorantraniliprol 0.0804 0.00792 Inf   0.0661   0.0973
## Testigo          0.0548 0.00663 Inf   0.0431   0.0693
##
## dias = 43:
## trat          prob      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Clorantraniliprol 0.0559 0.00670 Inf   0.0441   0.0706
## Testigo          0.0644 0.00716 Inf   0.0517   0.0799
##
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the logit scale
```



```

## Analysis of Deviance Table
##
## Model: quasibinomial, link: logit
##
## Response: val/100
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##
##           Df  Deviance Resid. Df Resid. Dev Pr(>Chi)
## NULL                               41    0.22214
## trat                               40    0.22207  0.9111
## factor(dias)                       1  0.0074003  39    0.21467  0.2430
## trat:factor(dias)                   1  0.0015920  38    0.21308  0.5881

## dias = 31:
## trat           prob      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Beauveria bassiana 0.0583 0.00498 Inf    0.0493    0.0689
## Testigo           0.0548 0.00559 Inf    0.0448    0.0668
##
## dias = 43:

## trat           prob      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Beauveria bassiana 0.0621 0.00513 Inf    0.0528    0.0729
## Testigo           0.0644 0.00603 Inf    0.0535    0.0773
##
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the logit scale

```

Fig. Nº 21: larvas.

```

## Analysis of Deviance Table
##
## Model: poisson, link: log
##
## Response: val
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##
##           Df Deviance Resid. Df Resid. Dev Pr(>Chi)
## NULL                               431    623.00
## trat                               1    0.074    430    622.92  0.785489
## factor(dias)                       2   47.096    428    575.83 5.931e-11 ***
## tam                                 1    1.855    427    573.97  0.173260
## trat:factor(dias)                   2    3.805    425    570.17  0.149170
## trat:tam                            1    1.802    424    568.36  0.179451
## factor(dias):tam                    2    2.622    422    565.74  0.269490

## trat:factor(dias):tam                2    9.796    420    555.95  0.007462 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

## tam = chica, dias = 5:
## trat          rate      SE  df  asymp.LCL  asymp.UCL  .group
## Clorantraniliprol 0.3611 0.1002 Inf    0.2097    0.622  a
## Testigo          0.4167 0.1076 Inf    0.2512    0.691  a
##
## tam = chica, dias = 31:
## trat          rate      SE  df  asymp.LCL  asymp.UCL  .group
## Clorantraniliprol 0.0833 0.0481 Inf    0.0269    0.258  a
## Testigo          0.5278 0.1211 Inf    0.3366    0.827  b
##
## tam = chica, dias = 43:
## trat          rate      SE  df  asymp.LCL  asymp.UCL  .group
## Testigo          0.8611 0.1547 Inf    0.6056    1.224  a
## Clorantraniliprol 1.0278 0.1690 Inf    0.7447    1.419  a
##
## tam = grande, dias = 5:
## trat          rate      SE  df  asymp.LCL  asymp.UCL  .group
## Testigo          0.4444 0.1111 Inf    0.2723    0.725  a
## Clorantraniliprol 0.4722 0.1145 Inf    0.2936    0.760  a
##
## tam = grande, dias = 31:
## trat          rate      SE  df  asymp.LCL  asymp.UCL  .group
## Testigo          0.1389 0.0621 Inf    0.0578    0.334  a
## Clorantraniliprol 0.2778 0.0878 Inf    0.1495    0.516  a
##
## tam = grande, dias = 43:
## trat          rate      SE  df  asymp.LCL  asymp.UCL  .group
## Testigo          0.6667 0.1361 Inf    0.4468    0.995  a
## Clorantraniliprol 0.7222 0.1416 Inf    0.4917    1.061  a
##
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale
## Tests are performed on the log scale
## significance level used: alpha = 0.05

```

Bb:

```

## Analysis of Deviance Table
##
## Model: poisson, link: log
##
## Response: val
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##
##              Df Deviance Resid. Df Resid. Dev Pr(>Chi)
## NULL
##          503    731.58
##
## trat          1    0.424    502    731.16  0.51472
## factor(dias)  1   47.518    501    683.64 5.449e-12 ***
## tam           1    6.450    500    677.19  0.01109 *
## trat:factor(dias)  1    0.651    499    676.54  0.41983
## trat:tam       1    1.880    498    674.66  0.17033
## factor(dias):tam  1    4.720    497    669.94  0.02981 *
## trat:factor(dias):tam  1    0.329    496    669.61  0.56645
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

## tam = chica, dias = 31:
## trat          rate      SE df asymp.LCL asymp.UCL .group
## Beauveria bassiana 0.2639 0.0605 Inf    0.1683    0.414  a
## Testigo        0.3519 0.0807 Inf    0.2244    0.552  a
##
## tam = chica, dias = 43:
## trat          rate      SE df asymp.LCL asymp.UCL .group
## Testigo        0.6296 0.1080 Inf    0.4499    0.881  a
## Beauveria bassiana 0.6528 0.0952 Inf    0.4905    0.869  a
##
## tam = grande, dias = 31:
## trat          rate      SE df asymp.LCL asymp.UCL .group
## Testigo        0.0926 0.0414 Inf    0.0385    0.222  a
## Beauveria bassiana 0.1389 0.0439 Inf    0.0747    0.258  a
##
## tam = grande, dias = 43:
## trat          rate      SE df asymp.LCL asymp.UCL .group
## Testigo        0.4444 0.0907 Inf    0.2979    0.663  a
## Beauveria bassiana 0.6111 0.0921 Inf    0.4548    0.821  a
##
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale
## Tests are performed on the log scale
## significance level used: alpha = 0.05

```

Fig. Nº 22: larvas parasitados.

```

## Analysis of Deviance Table
##
## Model: quasipoisson, link: log
##
## Response: val
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##
##          Df Deviance Resid. Df Resid. Dev Pr(>Chi)
## NULL                53    26.367
## trat                1   2.9110    52    23.456 0.009895 **
## factor(dias)        2   5.5452    50    17.910 0.001769 **
## trat:factor(dias)   2   0.9081    48    17.002 0.354242
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## dias = 5:
## trat          rate      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Clorantraniliprol 0.000 5.22e-06 Inf    0.0000    Inf
## Testigo          0.222 1.04e-01 Inf    0.0889    1
##
## dias = 31:
## trat          rate      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Clorantraniliprol 0.000 5.22e-06 Inf    0.0000    Inf
## Testigo          0.000 5.22e-06 Inf    0.0000    Inf
##
## dias = 43:
## trat          rate      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Clorantraniliprol 0.111 7.35e-02 Inf    0.0304    0
## Testigo          0.333 1.27e-01 Inf    0.1577    1
##
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale

```

```

## Analysis of Deviance Table
##
## Model: quasipoisson, link: log
##
## Response: val
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##
##           Df Deviance Resid. Df Resid. Dev Pr(>Chi)
## NULL                41    25.085
## trat                1  0.0000    40    25.085 1.00000
## factor(dias)        1  1.3283    39    23.756 0.16352
## trat:factor(dias)   1  2.8306    38    20.926 0.04195 *
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
Interaccion tratamiento x dias (p=0.04195):

```