

“ECOLOGÍA, DAÑO ECONÓMICO Y ORGANISMOS  
LOCALES DE CONTROL BIOLÓGICO DE LAS HORMIGAS  
CORTADORAS DE HOJAS DEL GÉNERO *Atta* EN  
PLANTACIONES DE *Pinus taeda* Y *Eucalyptus grandis* DE LA  
PROVINCIA DE MISIONES”

Ing. Forestal ABEL NICOLÁS SCHERF

Tesis presentada para optar al grado de  
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL  
NORDESTE EN EL ÁREA DE RECURSOS NATURALES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Corrientes  
República Argentina  
2023

“ECOLOGÍA, DAÑO ECONÓMICO Y ORGANISMOS  
LOCALES DE CONTROL BIOLÓGICO DE LAS HORMIGAS  
CORTADORAS DE HOJAS DEL GÉNERO *Atta* EN  
PLANTACIONES DE *Pinus taeda* Y *Eucalyptus grandis* DE LA  
PROVINCIA DE MISIONES”

Ing. Forestal ABEL NICOLÁS SCHERF

DIRECTORA

Phd. ROMINA DANIELA DIMARCO

Grupo de Ecología de Poblaciones de Insectos (GEPI), Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Bariloche (IFAB) (INTA-CONICET), San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

Department of Biology and Biochemistry, University of Houston, Houston, Texas, USA.

CO-DIRECTOR

Dr. JUAN CARLOS CORLEY

Grupo de Ecología de Poblaciones de Insectos (GEPI), Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Bariloche (IFAB) (INTA-CONICET), San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina

*Dedico esta tesis a todos los que trabajan la tierra, protegiéndola y respetándola.  
También la dedico a quienes hacen ciencia y la divulgan para que los que trabajan la  
tierra lo puedan hacer cuidándola un poco mejor*

## AGRADECIMIENTOS

Con gran aprecio y gratitud, deseo expresar mis sinceros agradecimientos a todas las personas e instituciones que han contribuido de manera significativa en la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, agradezco a Yeni, mi compañera de vida, quien ha sido mi pilar fundamental en todo este proceso que, en verdad, lo transitamos juntos. Fue quien se sentó a mi lado largas horas de escritura, de preparación de los materiales para los ensayos, carga de planillas, y un largo etcétera, sin importar si eran feriados o fines de semana. ¡Gracias mi amor!

En segundo lugar, a quienes comenzaron siendo mis compañeros de oficina y se transformaron en valiosos amigos: María Elena y Edy. Ambos han brindado un apoyo inmenso para que me adentre en el fascinante mundo de la investigación, a veces desafiante. En particular, mi agradecimiento especial a María Elena, quien generosamente compartió su conocimiento y tiempo, guiándome en todo lo que respecta al control biológico, otro gran y fascinante mundo ¡Muchas gracias María Elena! y ¡Muchas gracias Edy!

A mis directores, especialmente Romina, por su orientación experta, paciencia y dedicación a lo largo de este proceso. A pesar de la distancia, sus conocimientos y consejos han sido fundamentales tanto para mi formación personal como para cumplir nuestros objetivos de investigación. ¡Muchas gracias Romi! y ¡muchas gracias Juan!

A mis compañeros de laboratorio y campo, quienes han evolucionado de colegas a amigos. Cada uno de ustedes fue vital para el éxito de los ensayos y evaluaciones. ¡Muchas Gracias Diego A., Otto y Daiana! Además, no puedo dejar de agradecer a los muchachos del Campo Anexo Laharrage, que con el compromiso y calidad que los caracteriza, plantaron los ensayos de defoliación simulada ¡Muchas gracias Marcos, Jorge, Marcial y Roberto!

Mi agradecimiento se extiende de manera especial a aquellos que han proporcionado terrenos, plantaciones y recursos esenciales para la realización de los ensayos de esta tesis. A Hernan Patzer, Carlos Gioia, Fernando Aguirre, Lucas Taborda, Javier Giménez y Augusto Sequeira de Arauco Argentina S.A. Un agradecimiento particular a Tomás Haberle, productor y colega, por ceder un terreno con las características necesarias para que hagamos el ensayo de defoliación simulada. Así como al Establecimiento La

Misionera por permitirnos realizar los experimentos de control biológico en sus plantaciones.

Expreso mi gratitud a cada uno que hace que cada día de trabajo tenga una cuota de diversión ¡Gracias compañeros del INTA EEA Montecarlo! Especialmente a Delia S., Delia D., Iris, Lucas, Buga y Carla.

Mi agradecimiento se dirige también a las instituciones y sus líderes que han contribuido en mayor o menor medida al desarrollo de mi doctorado: el INTA, el CONICET, la UNNE y todas las universidades que dictaron los cursos de posgrado a los cuales asistí. En estos tiempos que corren, es necesario poner en valor la calidad que tienen dichas instituciones y lo importantes que son para el desarrollo de nuestra Nación.

A mi familia y amigos de la vida que gracias a ellos encuentro los momentos de alegría para renovarme.

Agradezco profundamente a mis padres, Irma y Ernesto, quienes a pesar de todas las dificultades supieron construir una familia arraigada en valores y han priorizado la educación y el bienestar de mis hermanos y mío. Todo lo que he logrado es gracias a ellos.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	13
ABSTRACT .....	16
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	19
Poblematica de las HCH en la provincia de Misiones.....	23
CAPÍTULO 1: Especies de HCH y abundancia de sus nidos en las forestaciones de <i>P. taeda</i> , <i>E. grandis</i> y en los parches de bosque nativo cercanos .....	26
1.1 INTRODUCCIÓN .....	26
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
1.3 RESULTADOS .....	29
1.4 DISCUSIÓN.....	32
CAPÍTULO 2: Hábitos de forrajeo de <i>A. sexdens</i> en plantaciones de <i>P. taeda</i> , <i>E. grandis</i> y en la interfase con el bosque nativo.....	34
2.1 INTRODUCCIÓN.....	34
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.3 RESULTADOS .....	37
CAPÍTULO 3: Nivel de daño económico de <i>A. sexdens</i> en plantaciones menores a dos años de <i>P. taeda</i> y de <i>E. grandis</i> .....	44
3.1 INTRODUCCIÓN.....	44
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.3 RESULTADOS .....	53
3.4 DISCUSIÓN .....	65
CAPÍTULO 4: Impacto a largo plazo de <i>A. sexdens</i> sobre una plantación de <i>P. taeda</i> .....	70
4.1 INTRODUCCIÓN.....	70
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	72
4.3 RESULTADOS .....	74

4.4 DISCUSIÓN .....	77
CAPÍTULO 5: Selección de un aislamiento local de hongo entomopatógeno del género <i>Beauveria</i> para el control de <i>A. sexdens</i> .....	80
5.1 INTRODUCCIÓN .....	80
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
5.3 RESULTADOS .....	88
5.4 DISCUSIÓN .....	94
CAPÍTULO 6: Efectividad de un aislamiento local del hongo entomopatógeno <i>Beauveria</i> sp. para el control en campo de nidos de <i>Atta sexdens</i> .....	97
6.1 INTRODUCCIÓN .....	97
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
6.3 RESULTADOS .....	107
6.4 DISCUSIÓN .....	114
7. CONCLUSIONES GENERALES .....	118
8. BIBLIOGRAFÍA .....	123

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Localidades de la Provincia de Misiones donde se evaluaron las comunidades de HCH.	27
Figura 2. Abundancias de nidos y superficie cubierta de especies de HCH encontradas en distintos ambientes. Diferentes letras entre barras indican diferencias significativas en las abundancias de <i>A. sexdens</i> entre los ambientes evaluados según la prueba de a pares de Wilcoxon, las abundancias de <i>Ac. subterraneus</i> y <i>Ac. heyeri</i> no presentaron diferencias significativas entre ambientes. BN: bosque nativo aledaño, PT_J: <i>P. taeda</i> juvenil, PT_A: <i>P. taeda</i> adulto, EG_J: <i>E. grandis</i> juvenil, EG_A: <i>E. grandis</i> adulto.	30
Figura 3. NMDS de las comunidades de HCH encontradas en distintos ambientes. Li: Puerto libertad, Wa: Wanda, De: Puerto Delicia, Vi: Colonia Victoria, Pi: Puerto Piray.	31
Figura 4. Localidades de la Provincia de Misiones donde se evaluó el forrajeo de <i>A. sexdens</i> .	36
Figura 5. Número de elementos acarreados en 20 minutos por nido de <i>A. sexdens</i> en tres ambientes evaluados durante las cuatro estaciones del año. Segmentos de barra marcados con letras distintas resultaron significativamente diferentes entre sí en las comparaciones post hoc de a pares del mismo tipo y estado del material con corrección de los p-valores con el método de Bonferroni, las comparaciones de los segmentos sin letras agregadas resultaron no significativas.	38
Figura 6. Peso seco promedio de elementos acarreados en 20 minutos por nido de <i>A. sexdens</i> en tres ambientes evaluados. Segmentos de barra marcados con letras distintas resultaron significativamente diferentes entre sí en las comparaciones post hoc de a pares del mismo tipo y estado del material con corrección de los p-valores con el método de Bonferroni, las comparaciones de los segmentos sin letras agregadas resultaron no significativas.	39
Figura 7. Número promedio de elementos acarreados en 20 minutos por nido de <i>A. sexdens</i> en tres ambientes evaluados durante las cuatro estaciones del año. Segmentos de barra marcados con letras distintas resultaron significativamente diferentes entre sí en las comparaciones post hoc de a pares del mismo tipo y estado del material con corrección de los p-valores con el método de Bonferroni, las comparaciones de los segmentos sin letras agregadas resultaron no significativas.	40
Figura 8. Peso seco (g) promedio de los elementos acarreados en 20 minutos por nido de <i>A. sexdens</i> en tres ambientes evaluados durante las cuatro estaciones del año. Segmentos de barra marcados con letras distintas resultaron significativamente diferentes entre sí en las comparaciones post hoc de a pares del mismo tipo y estado del material con corrección de los p-valores con el método de Bonferroni, las comparaciones de los segmentos sin letras agregadas resultaron no significativas.	40
Figura 9. Croquis de la ubicación geográfica del ensayo y de la ubicación de los tratamientos dentro de cada ensayo con diseño completamente aleatorizado.	46
Figura 10. Detalle de la defoliación simulada con tijeras. a) Planta juvenil de <i>P. taeda</i> con un nivel de defoliación del 75 % (T5). b) Planta juvenil de <i>E. grandis</i> con un nivel de defoliación del 100 % con corte del meristema apical (T7).	48
Figura 11. Ubicación geográfica de los lotes donde se instalaron las parcelas circulares para la determinación del daño producido por <i>A. sexdens</i> en plantaciones recientes de <i>P. taeda</i> y <i>E. grandis</i> .	51
Figura 12. Esquema de una parcela circular de 1 ha de superficie, dividida en cuadrantes por ejes cartesianos y con un nido focal de <i>A. sexdens</i> .	52

Figura 13. Curvas de sobrevivencia de plantas de <i>P. taeda</i> sometidas a distintos niveles de defoliación.	54
Figura 14. Curvas de sobrevivencia de plantas de <i>E. grandis</i> sometidas a distintos niveles de defoliación.	54
Figura 15. Perfiles del crecimiento en diámetro a la altura del cuello (a), altura total (b) e índice de volumen (c) de plantas juveniles de <i>P. taeda</i> sometidas a distintas intensidades de defoliación artificial. T1: 0 %, T2: 10 %, T3: 30 %, T4: 50 %, T5: 75 %, T6: 100 % y T7: 100 % con corte del meristema apical. Las barras corresponden al desvío estándar del modelo.	55
Figura 16. Perfiles del crecimiento en diámetro a la altura del cuello (a), altura total (b) e índice de volumen (c) de plantas juveniles de <i>E. grandis</i> sometidas a distintas intensidades de defoliación artificial. T1: 0 %, T2: 10 %, T3: 30 %, T4: 50 %, T5: 75 %, T6: 100 % y T7: 100 % con corte del meristema apical. Las barras corresponden al desvío estándar del modelo.	56
Figura 17. Correlación entre el porcentaje de defoliación de las plantas y la pérdida económica que se produce en <i>P. taeda</i> (a) y <i>E. grandis</i> (b).	60
Figura 18. Frecuencias relativas de las distintas clases de daño producidas por <i>A. sexdens</i> en las tres evaluaciones realizadas sobre las parcelas circulares de <i>P. taeda</i> y <i>E. grandis</i> . C-0: sin daño, C-1: 1-50 % de defoliación, C-2: 51-75 % de defoliación, C-3: 76-99 % de defoliación, C-4: 100 % de defoliación con y sin corte de meristema apical. C-5: planta muerta por el ataque de <i>A. sexdens</i> . C-6: planta muerta por otro motivo, C-7: planta atacada al 100 % y que rebrotó.	62
Figura 19. Correlación en las tres evaluaciones entre la frecuencia relativa de plántulas de <i>P. taeda</i> no atacadas y con defoliación total por <i>A. sexdens</i> en función a su distancia al hormiguero.	63
Figura 20. Correlación en las tres evaluaciones entre la frecuencia relativa de plántulas de <i>E. grandis</i> no atacadas y con defoliación total por <i>A. sexdens</i> en función a su distancia al hormiguero.	63
Figura 21. (a) Mapa de la principal zona de Argentina donde se ubican las plantaciones de pino (Instituto Geográfico Nacional de la República Argentina, 2022; Ministerio del Agro y la Producción, 2022), y distribución de <i>A. sexdens</i> en dicha zona (basado en Farji-Brener y Ruggiero, 1994). (b) Croquis de la plantación de <i>P. taeda</i> con los dos tratamientos y la ubicación de las parcelas circulares de muestreo.	73
Figura 22. (a) Perfiles de crecimiento del diámetro promedio a la altura del pecho (DAP) de <i>P. taeda</i> . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ). (b) Imagen de una parcela permanente de muestreo que muestra árboles de <i>P. taeda</i> defoliados por <i>A. sexdens</i> .	75
Figura 23. Perfiles de crecimiento en altura total promedio de <i>P. taeda</i> . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ).	76
Figura 24. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de obreras mayores de <i>A. sexdens</i> tratadas con 11 aislamientos locales de <i>Beauveria</i> spp. más un control (C). Las letras distintas, ubicadas entre paréntesis al costado de la leyenda de los tratamientos, indican diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Log-rank entre pares de curvas, con ajuste por el método de Bonferroni para mantener el $\alpha$ igual a 0,05.	90
Figura 25. Porcentaje de germinación de conidios de los 11 aislamientos evaluados en el bioensayo 1. Barras con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Hommel para comparaciones múltiples.	92
Figura 26. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de obreras mayores de <i>A. sexdens</i> tratadas con tres aislamientos locales de <i>Beauveria</i> spp. más un control (C). Las letras	93

distintas, ubicadas entre paréntesis al costado de la leyenda de los tratamientos, indican diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Log-rank entre pares de curvas, con ajuste por el método de Bonferroni para mantener el $\alpha$ igual a 0,05.	
Figura 27. Porcentaje de germinación de conidios de los 11 aislamientos evaluados en el bioensayo 1. Barras con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Hommel para comparaciones múltiples.	94
Figura 28. a) Detalle del lugar de aplicación del bioformulado cebo. b) Detalle de la aplicación del bioformulado polvo.	104
Figura 29. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de obreras mayores de <i>A. sexdens</i> tratadas con tierra de diatomeas. C1: sin aplicación, C2: fécula de maíz 100 %, T1: PosturaSec® 100 %, T2: PosturaSec® + Fécula de maíz (1:2), T3: PosturaSec® + Fécula de maíz (2:1), T4: DiatomiD® 100 %, T5: DiatomiD® + Fécula de maíz (1:2), T6: DiatomiD® + Fécula de maíz (2:1). Las letras distintas, ubicadas entre paréntesis al costado de la leyenda de los tratamientos, indican diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Log-rank entre pares de curvas, con ajuste por el método de Bonferroni para mantener el $\alpha$ igual a 0,05.	107
Figura 30. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de obreras mayores de <i>A. sexdens</i> tratadas con diferentes formulaciones del aislamiento H7 de <i>Beauveria</i> sp. C: control. T1: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 5 %, T2: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 10 %, T3: Polvo de H7 + tierra de diatomeas, T4: Polvo de H7 + fécula de maíz, T5: Polvo puro de H7. Las letras distintas, ubicadas entre paréntesis al costado de la leyenda de los tratamientos, indican diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Log-rank entre pares de curvas, con ajuste por el método de Bonferroni para mantener el $\alpha$ igual a 0,05.	109
Figura 31. Niveles de actividad en las bocas de los nidos de campo de <i>A. sexdens</i> en el transcurso de las evaluaciones semanales del experimento.	111
Figura 32. Cantidad de dosis acarreada por boca en cada una de las tres aplicaciones de este bioformulado.	112
Figura 33. Supervivencia de nidos de campo de <i>A. sexdens</i> a las 13 semanas posteriores a la primera aplicación de los tratamientos. Letras en común en las barras indican que no existen diferencias estadísticas significativas (GL: 2; $\chi^2$ : 6,7; p-valor: 0,036)	113
Figura 34. Porcentaje de obreras de <i>A. sexdens</i> con muerte confirmada por la acción de <i>Beauveria</i> sp. en cada una de las tres colectas. Las barras corresponden al desvío estándar del modelo. Los números indican la cantidad total de obreras recolectadas para el correspondiente tratamiento y semana.	114

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Ambientes evaluados para la determinación de riqueza y abundancia de HCH.	28
Tabla 2. Clasificación del material, por tipo y estado, acarreado por las colonias de <i>A. sexdens</i> localizadas en las plantaciones de <i>P. taeda</i> y <i>E. grandis</i> y en las interfases con el bosque nativo.	37
Tabla 3. Descripción de los tratamientos del ensayo de intensidades de defoliación	47
Tabla 4. Clases de daño utilizadas para caracterizar el ataque de <i>A. sexdens</i> sobre plantaciones recientes de <i>P. taeda</i> y <i>E. grandis</i> . Adaptado de Nickele (2007).	52
Tabla 5. Medias ajustadas por su respectivo modelo de las tres variables estudiadas sobre <i>P. taeda</i> y <i>E. grandis</i> en el periodo de evaluación. Letras en común indica que no existen diferencias significativas (Prueba de Tukey, $\alpha=0,05$ , con valores de p ajustados por el método de Bonferroni), comparaciones realizadas para cada especie, variable y número de evaluación. T3: defoliación simulada del 30 %; T8: defoliación real del 30 %; T6: defoliación simulada del 100 %; T9: defoliación real del 100 %.	58
Tabla 6. Pérdida económica (PE) de cada nivel de defoliación de <i>P. taeda</i> y de <i>E. grandis</i> . IV: Índice de Volumen promedio en la última evaluación del experimento. IPP: Índice de Pérdida de Plantas (0 %-100 %). CP: Costo de plantación lograda según Colegio de Ingenieros Forestales de Misiones (2022) transformado a dólares estadounidenses. (*): Valores negativos de IPP fueron consignados como 0 % y valores superiores a 100 % fueron consignados como 100 % de pérdida.	59
Tabla 7. Nivel económico de defoliación de <i>P. taeda</i> y <i>E. grandis</i> para tres escenarios de costo de control de HCH. y: costo de control o pérdida económica. x: Nivel económico de defoliación o porcentaje de defoliación.	60
Tabla 8. Nivel de daño económico (NDE) de <i>A. sexdens</i> para plantaciones juveniles de <i>P. taeda</i> y <i>E. grandis</i> , considerando tres escenarios de costo de control.	64
Tabla 9. Análisis de la varianza de las pruebas de hipótesis secuenciales para el diámetro a la altura del pecho (DAP) y altura total de árboles de <i>P. taeda</i> ( $\alpha=0,05$ )	75
Tabla 10. Volumen de madera comercial de <i>P. taeda</i> en los tratamientos control total de HCH y sin control de HCH en cada año. Calculado con el software PLAFORNEA.	77
Tabla 11. Aislamientos de hongos entomopatógenos obtenidos a partir de nidos de <i>A. sexdens</i> en distintos cultivos de la provincia de Misiones, Argentina.	89
Tabla 12. Tiempo letal medio de cada tratamiento en el bioensayo 1. No se pudo determinar el tiempo letal medio del tratamiento control (C) ya que presentó una supervivencia mayor al 50 % en el período evaluado de 10 días.	91
Tabla 13. Mortalidad confirmada y total de obreras mayores de <i>A. sexdens</i> enfrentadas a 11 aislamientos locales de <i>Beauveria</i> spp. Los tratamientos con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.	88
Tabla 14. Tiempo letal medio de cada tratamiento en el bioensayo 2. No se pudo determinar el tiempo letal medio del tratamiento control (C) ya que presentó una supervivencia mayor al 50 % en el período evaluado de 10 días.	93
Tabla 15. Mortalidad confirmada y total de obreras mayores de <i>A. sexdens</i> enfrentadas a tres aislamientos locales de <i>Beauveria</i> spp. Los tratamientos con letras en común no son	94

estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.	
Tabla 16. Tratamientos del bioensayo de selección de tierra de diatomeas.	100
Tabla 17. Tratamientos del bioensayo de evaluación del efecto combinado de <i>Beauveria</i> sp. y tierra de diatomeas.	101
Tabla 18. Número de bocas activas y dosis aplicadas a cada nido de <i>A. sexdens</i> .	105
Tabla 19. Escala utilizada para la evaluación de la actividad de las bocas de los hormigueros.	105
Tabla 20. Tiempo letal medio de cada tratamiento. No se pudo determinar el tiempo letal medio de los controles (C1 y C2) ya que presentó una supervivencia mayor al 50 % en el período evaluado de 10 días. C1: sin aplicación, C2: fécula de maíz 100 %, T1: PosturaSec® 100 %, T2: PosturaSec® + Fécula de maíz (1:2), T3: PosturaSec® + Fécula de maíz (2:1), T4: DiatomiD® 100 %, T5: DiatomiD® + Fécula de maíz (1:2), T6: DiatomiD® + Fécula de maíz (2:1).	108
Tabla 21. Mortalidad total de obreras mayores de <i>A. sexdens</i> tratadas con tierra de diatomeas. C1: sin aplicación, C2: fécula de maíz 100 %, T1: PosturaSec® 100 %, T2: PosturaSec® + Fécula de maíz (1:2), T3: PosturaSec® + Fécula de maíz (2:1), T4: DiatomiD® 100 %, T5: DiatomiD® + Fécula de maíz (1:2), T6: DiatomiD® + Fécula de maíz (2:1). Los tratamientos con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.	108
Tabla 22. Tiempo letal medio de cada tratamiento. No se pudo determinar el tiempo letal medio del control ya que presentó una supervivencia mayor al 50 % en el período evaluado de 10 días. C: control. T1: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 5 %, T2: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 10 %, T3: Polvo de H7 + tierra de diatomeas, T4: Polvo de H7 + fécula de maíz, T5: Polvo puro de H7	110
Tabla 23. Mortalidad total y confirmada de obreras mayores de <i>A. sexdens</i> tratadas con diferentes formulaciones del aislamiento H7 de <i>Beauveria</i> sp. Los tratamientos con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. C: control. T1: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 5 %, T2: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 10 %, T3: Polvo de H7 + tierra de diatomeas, T4: Polvo de H7 + fécula de maíz, T5: Polvo puro de H7	110
Tabla 24. Análisis de la varianza del modelo ajustado de medidas repetidas en el tiempo.	113

## RESUMEN

Las hormigas cortadoras de hojas son insectos eusociales de la región Neotropical que forrajea tejidos vegetales para cultivar un hongo simbionte en el interior de sus nidos. Su forrajeo es intenso y selectivo, puede representar hasta el 25 % de la herbivoría total en los bosques Neotropicales. En las áreas de cultivo, las densidades de nidos de hormigas cortadoras de hojas pueden ser muy altas. Un tipo de cultivo atacado por estas hormigas es el forestal y cuando anidan allí pueden volverse importantes plagas. Uno de los pilares de la economía de la Provincia Argentina de Misiones es la actividad forestal. Existen 355.086 hectáreas de plantaciones forestales, la gran mayoría corresponde a los géneros *Pinus* L. y *Eucalyptus* L'Hér., en las cuales las hormigas cortadoras de hojas son las plagas más importantes.

El control de las hormigas cortadoras de hojas es complejo, por eso, se sugiere que el enfoque apropiado es el manejo integrado de plagas. Para poder establecer este tipo de programas es necesario contar con información y herramientas que hasta ahora habían sido poco exploradas en la región. En este sentido, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Identificar las especies de hormigas cortadoras de hojas presentes y determinar sus abundancias tanto en las plantaciones forestales como en el bosque nativo aledaño.
- Determinar si los hormigueros de *Atta sexdens* L. situados en las interfases de los parches de bosques nativos y las plantaciones forestales componen su dieta en forma diferente a aquellos hormigueros que se encuentran en el interior de dichas plantaciones. Además, describir si estas diferencias o similitudes se mantienen a lo largo de las cuatro estaciones del año.
- Determinar el nivel de daño económico de la especie de hormigas cortadoras de hojas más importante de Misiones, *A. sexdens*, utilizando criterios de valoración al costo de plantaciones forestales de *Pinus taeda* L. y *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden.
- Determinar los efectos a largo plazo de *A. sexdens* en plantaciones de *P. taeda* en el NE de Argentina.

- Aislar y seleccionar, en condiciones de laboratorio, un aislamiento local de hongos entomopatógenos del género *Beauveria* Vuill. con potencial para el control de nidos de campo de *A. sexdens*.
- Evaluar la actividad de un aislamiento local de *Beauveria* sp. formulado como polvo seco en el laboratorio, y determinar su efectividad para el control de nidos de *A. sexdens* en el campo.

Para cumplir con cada uno de estos objetivos propuestos, se llevaron adelante en el área de estudio una serie de muestreos y experimentos que condujeron a los siguientes resultados:

- Las especies de hormigas cortadoras de hojas asociadas a las plantaciones forestales y al bosque nativo aledaño fueron *A. sexdens* y *Acromyrmex subterraneus* Forel. Una tercera especie, *Acromyrmex heyeri* Forel, fue considerada rara por haberse encontrado un solo nido en una plantación adulta de *Eucalyptus grandis*. *A. sexdens*, fue la especie dominante en todos los tipos de plantaciones forestales evaluados. Las comunidades de hormigas cortadoras de hojas de las forestaciones y las del bosque nativo aledaño fueron diferentes.
- *A. sexdens* modificó su dieta cuando sus nidos se establecieron en lugares con mayor disponibilidad de especies palatables, en comparación con los nidos del interior de monocultivos forestales. La proporción de la dieta que proviene del ataque a las plantaciones se reduce a la mitad en la interfase de las plantaciones con el bosque nativo aledaño, con respecto a los nidos del interior de las plantaciones.
- El nivel de daño económico de *A. sexdens* en plantaciones juveniles de *Pinus taeda* de Misiones se ubica entre un nido cada 0,97 ha y un nido cada 0,77 ha. En plantaciones juveniles de *E. grandis* se encuentra entre un nido cada 1,19 ha y un nido cada 0,62 ha.
- El ataque continuo de *A. sexdens* a plantaciones de *P. taeda* más allá del periodo de establecimiento, puede reducir significativamente su volumen de madera comercial. Al sexto año, una densidad de 7,36 nidos por hectárea redujo el volumen de madera comercial en un 21 % respecto a una plantación sin hormigueros.
- Se encontraron 11 aislamientos locales de *Beauveria* spp. que se mostraron activos contra *A. sexdens*. Tres de estos aislamientos (H6, H7 y H17) fueron los

que mejor desempeño mostraron en las pruebas de laboratorio, sin embargo, H7 presentó mejores cualidades para la producción de conidios, por lo tanto, fue seleccionado para las pruebas de control de nidos en el campo.

- El aislamiento H7 de *Beauveria* sp. combinado con tierra de diatomeas fue la formulación de polvo seco más efectiva para el control de *A. sexdens* en condiciones de laboratorio. Esta misma combinación fue la más efectiva para el control de hormigueros de campo en comparación con el bioformulado como cebo. El insuflado al interior de los hormigueros de la mezcla de *Beauveria* sp. y tierra de diatomeas produjo la mortalidad del 80 % de los nidos tratados y una notoria reducción de la actividad. En la última evaluación, los nidos tratados con el polvo, presentaron muerte o inactividad en el 96 % de sus bocas, en los tratados con cebo el porcentaje de bocas muertas e inactivas alcanzó el 76 %, en tanto que, en el control sin aplicación fue solamente del 4 %.

Este trabajo aporta conocimientos y herramientas poco exploradas que son de importancia para los productores en el desarrollo de estrategias de manejo integrado, contra la principal especie de hormiga cortadoras de hojas en las plantaciones forestales de la provincia de Misiones.

## ABSTRACT

Leaf-cutting ants are eusocial insects native to the Neotropical region, which forage plant material to cultivate a symbiotic fungus within their nests. Their intense and selective foraging can constitute up to 25% of the total herbivory in Neotropical forests. In cultivated areas, the density of leaf-cutting nests could be very high. One type of crop attacked by these ants are forestry plantations, and when they nest within plantations, they can become significant pests. One of the pillars of the economy in the Province of Misiones, Argentina is forestry. There are 355,086 hectares of forest plantations, the vast majority consisting of *Pinus* L. and *Eucalyptus* L'Hér. genera, where leaf-cutting ants are the most important pests.

Due to the complexity of controlling leaf-cutting ants, it is suggested that the appropriate approach for their managing is the integrated pest management. In order to establish this type of programs, it is necessary to have information and tools that until now had been little explored in the region. Therefore, this study aimed to address the following objectives:

- Identify the species of leaf-cutting ants present in several places in Misiones, and determine their abundances in both forest plantations and adjacent native forests.
- Determine whether nests of *Atta sexdens* L. located at the interfaces between native forest patches and forest plantations have a different diet composition compared to nests within the plantations. Additionally, describe whether these differences or similarities persist throughout the four seasons of the year.
- Assess the level of economic damage caused by the most important species of leaf-cutting ant in Misiones, *A. sexdens*, using valuation criteria based on the cost of *Pinus taeda* L. and *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden forest plantations.
- Determine the long-term effects of *A. sexdens* on *P. taeda* plantations in northeastern Argentina.
- Isolate and select a local strain of entomopathogenic fungi from the *Beauveria* Vuill. genus with potential for controlling nests of *A. sexdens* under laboratory conditions.

- Evaluate the activity of a locally isolated *Beauveria* sp. strain formulated as dry powder in the laboratory and determine its effectiveness in controlling *A. sexdens*' nest in the field.

To achieve each of these proposed objectives, a series of samplings and experiments were carried out in the study area, leading to the following results:

- The leaf-cutting ant species associated with forest plantations and the adjacent native forest are *A. sexdens* and *Acromyrmex subterraneus* Forel. A third species, *Acromyrmex heyeri* Forel, is considered rare, as only one nest was found in a mature *E. grandis* plantation. *A. sexdens* was the dominant species in all types of evaluated forest plantations. The leaf-cutting ant communities in the forest plantations and in the adjacent native forest differ.
- *A. sexdens* modified its diet when its nests are established in areas with higher availability of palatable plant species, compared to nests within forest monocultures. The proportion of their diet that comes from foraging plantations is reduced by half at the interface of the plantations with the surrounding native forest, in comparison to the nests within the plantations.
- The level of economic damage caused by *A. sexdens* in juvenile *P. taeda* plantations in Misiones is between one nest every 0,97 ha and one nest every 0,77 ha. In juvenile *E. grandis* plantations there is between one nest every 1,19 ha and one nest every 0,62 ha.
- Prolonged attacks by *A. sexdens* on *P. taeda* plantations beyond the establishment period, can significantly reduce their volume of commercial wood. By the sixth year, a density of 7,36 nests per hectare resulted in a 21 % reduction in commercial wood volume compared to a plantation without leaf-cutting ant nests.
- Eleven local strains of *Beauveria* spp. were found to be active against *A. sexdens*. Among these, three strains (H6, H7, and H17) performed best in laboratory tests. However, H7 exhibited better conidial production qualities and was selected for field nest control tests.
- H7 strain of *Beauveria* sp. combined with diatomaceous earth was the most effective dry powder formulation for controlling *A. sexdens* under laboratory conditions. This same combination was the most effective for controlling field nests compared to the bait-based bioformulation. Insufflating the

mixture of *Beauveria* sp. and diatomaceous earth into ant nests resulted in 80 % mortality and a notable reduction in the activity of treated nests. In the last evaluation, the nests treated with the powder showed death or inactivity in 96% of their mouths, in those treated with bait the percentage of dead and inactive mouths reached 76%, while in the control without application It was only 4% of the nests treated.

This study provides little explored knowledge and tools that are important for foresters in the development of integrated management strategies, against the main leaf-cutting ant species in forest plantations in Misiones, Argentina.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las hormigas cortadoras de hojas (HCH, de aquí en más) son himenópteros de la familia Formicidae, pertenecientes a la tribu Attini la cual está conformada por especies de hormigas cultivadoras de hongos en simbiosis mutualista (Wilson, 1971; Wetterer et al., 1998; Currie, 2001; Della-Lucia, 2011; Da Silva Camargo et al., 2015). Actualmente se reconocen 53 especies de HCH: 17 del género *Atta* Fabr., 33 de *Acromyrmex* Mayr. y tres de *Amoimyrmex* Cristiano, Cardoso y Sandoval (Borgmeier, 1959; Gonçalves, 1961; Cristiano et al., 2020; Bolton, 2023), todas ellas de distribución exclusivamente Neotropical, comprendida desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el sur de la República Argentina (Sánchez-Restrepo et al., 2019). Las HCH utilizan las hojas, flores, frutos y brotes tiernos de las plantas para cultivar su hongo mutualista en el interior de sus nidos subterráneos, estos hongos son basidiomicetes de la familia Agaricaceae, y constituyen la fuente de alimentación para las larvas y la reina (Fisher et al., 1994; Currie, 2001; Miyashira et al., 2010; Lange y Grell, 2014; Bich et al., 2017).

Las HCH viven en colonias muy numerosas, que pueden alcanzar cinco a ocho millones de individuos (Fowler et al., 1986) y además pueden ser muy longevas, ya que se han registrado nidos de *Atta cephalotes* L. de 12 años de edad y de *Acromyrmex octospinosus* Reich de 10 años (Weber, 1977; Wirth et al., 2003; Hermann, 2012). Son insectos eusociales, en sus nidos ocurre una división del trabajo reproductivo, superposición de generaciones y cooperación de la descendencia en los cuidados de la cría (Wilson y Hölldobler, 2005). Además, las hormigas presentan comportamientos individuales altruistas en beneficio de la colonia (López-Riquelme y Ramón, 2010). La división del trabajo se da a nivel de castas. La casta obrera está conformada por hembras estériles y ápteras que se ocupan de actividades como el cuidado y mantenimiento del hongo simbiote, cuidado de la cría, mantenimiento del hormiguero, exploración, selección, corte y transporte de material vegetal y la defensa de la colonia, entre otras. Las obreras se dividen en sub castas de acuerdo a su tamaño, de esta manera se pueden identificar obreras menores, medianas y mayores. El tamaño de las obreras se correlaciona con el tipo de labores que cumplen en la colonia (Hölldobler y Wilson, 1990). A grandes rasgos, las obreras menores se ocupan principalmente del cuidado del hongo y de la cría, las medianas se encargan de la búsqueda, corte y transporte de material vegetal y las obreras mayores están asociadas a la defensa de la colonia, por

ello muchas veces reciben la denominación de “soldados”. Por otro lado, la casta sexual se encarga de la reproducción de la especie, está conformada por hembras y machos alados y con órganos reproductivos funcionales. Las hembras fecundadas son denominadas como “reinas”, son las encargadas de la postura de huevos que dan lugar a toda la progenie. En general las colonias de las HCH son monogínicas, es decir que existe una sola reina por colonia (Fernandez-Marin et al., 2004). Como las HCH poseen partenogénesis arrenotoca, cuando la reina pone huevos sin fecundar, estos darán lugar a individuos machos cuya única función es la de fecundar a las nuevas reinas en la temporada reproductiva (Hölldobler y Wilson, 1990; Fernández, 2003).

La reproducción de las HCH se da en la estación favorable. En la Mesopotamia Argentina, esto ocurre a mediados de la primavera. Machos y reinas vírgenes salen a volar en simultáneo de los nidos de una región, para realizar la cópula que generalmente ocurre en vuelo, este evento es denominado “vuelo nupcial”. Una vez fecundada, la reina joven desciende a la tierra para generar una nueva colonia, donde inmediatamente comienza a poner huevos que darán lugar en pocos días a la población de obreras (Hölldobler y Wilson, 1990). Una vez establecida la colonia, esta permanecerá activa durante toda la vida de la reina, en ese tiempo buscarán material vegetal a decenas de metros del nido (Vasconcelos, 1990). En términos generales, a partir del tercer año los nidos de HCH tienen la capacidad de generar vuelos nupciales anualmente (Marinho et al., 2011).

Al mostrar una actividad de alimentación muy intensa durante todo el año, las HCH atacan una amplia variedad de especies de plantas. Si bien estrictamente son fungívoras, por la diversidad de su dieta, se las considera como herbívoros generalistas. Este grupo de insectos representa alrededor del 25 % de toda la herbivoría en los ecosistemas del Bosque Neotropical, eliminando entre el 10 % y el 15 % de todas las hojas que se encuentran en su área de alimentación (Swanson et al., 2019). A pesar de esto, tienen predilección por determinadas especies o grupos de plantas, por ejemplo, aquellas que son pioneras en las etapas de la sucesión vegetal y que, por ser estrategias “r”, invierten su energía en crecer y reproducirse en lugar de generar mecanismos de defensa anti-herbivoría (Farji-Brener, 2001). Dentro de las especies predilectas también se encuentran muchas de las especies vegetales exóticas (Blanton y Ewel, 1985) y las nativas fertilizadas como el *Inga oerstediana* (Benth) (Nichols-Orians, 1991).

Este grupo de hormigas cumple un rol muy importante en los ecosistemas donde se distribuyen naturalmente. Su forrajeo selectivo y la dispersión de semillas les confieren la capacidad de modificar la estructura y composición florística, y también cambian la física, química y la dinámica del ciclo de los nutrientes en el suelo donde establecen sus nidos (Montoya-Lerma et al., 2012; Swanson et al., 2019). Gracias a esto, distintos autores las han nombrado como “ingenieras del ecosistema” (Folgarait, 1998; Montoya-Lerma et al., 2012; Swanson et al., 2019).

En ambientes con gran disponibilidad de vegetales predilectos, con escasa cobertura del suelo y falta de enemigos naturales, las poblaciones de HCH proliferan. Wirth et al. (2007) encontraron densidades crecientes de HCH en cercanías de los bordes del Bosque Atlántico, que son lugares donde abundan las especies vegetales pioneras (Urbas et al., 2007; Amaya-Hernández et al., 2019). Lo mismo ocurre en las áreas de cultivo donde las densidades de nidos de HCH pueden ser muy altas, ese es el caso de Scherf et al., (2022a) quienes encontraron densidades casi 4 veces mayores en plantaciones de *P. taeda* que las reportadas por Wirth et al. (2007) en bosques naturales. Un tipo de cultivo atacado por las HCH es el forestal. Los cultivos forestales pueden sufrir importantes consecuencias como la mortalidad de plantas o la reducción de su crecimiento, y la mayor vulnerabilidad ocurre en las etapas iniciales (Montoya-Lerma et al., 2012; Scherf et al., 2022a). Esto es muy notorio en el caso de los cultivos forestales de la región neotropical, donde las HCH son reconocidas como la principal plaga y se destinan importantes esfuerzos a su control (Alípio, 1989; De Coll, 2004; Della Lucia, 2003; Montoya-Lerma et al., 2012).

En la actualidad, el control de las HCH no es especie-específico y se utilizan métodos primordialmente químicos, mediante la aplicación de diferentes compuestos en formulaciones de cebos granulados, polvos secos y termonebulización (Costa et al., 2008; Jung et al., 2013; Nuñez et al., 2020; Montoya-Lerma et al., 2012; Bollazzi et al., 2014). Entre los principios activos más utilizados se encuentran el fipronil, la sulfluramida, el clorpirifós, la deltametrina, el fenitrotión, entre otros. Algunos de ellos han sido clasificados por la FAO como contaminantes orgánicos persistentes y su uso se ha restringido. Este es el caso de la sulfluramida y del clorpirifós, que al degradarse se transforman en PFOS, un contaminante muy tóxico, persistente y bioacumulable, sujeto a medidas de restricción de alcance mundial luego de la entrada en vigor del Convenio de Estocolmo en el año 2004, pero con exención de uso para el control de HCH

(Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación, 2017). Otros de los principios activos, como el fipronil, no generan PFOS, pero representan un alto riesgo para la salud de las personas y del ambiente porque tienen una mayor toxicidad aguda sobre mamíferos, organismos acuáticos, peces y abejas (United Nations Environment Programme, 2013).

A diferencia de los protocolos de manejo implementados en varias etapas del proceso de invasión de especies exóticas, el desafío con especies plagas nativas oportunistas como las HCH (Montoya-Lerma et al., 2012), consiste en manejar sus poblaciones de manera que se reduzcan sus impactos en los cultivos, y no dañarlas de manera irreversible. A esto, se suma la demanda del mundo actual por productos y procesos sustentables. En este sentido, el manejo integrado de plagas (MIP) se presenta como un modelo de gestión de plagas que se adapta al caso de las HCH y las exigencias globales de sustentabilidad. El MIP es un modelo que integra las dimensiones económicas, ambientales y sociales, con el propósito de que los agroecosistemas sean sustentables. Todo MIP tiene como punto de partida conocer en detalle la plaga (su correcta identificación y biología), a partir de allí se consideran cinco etapas para establecer su manejo: prevención, monitoreo, toma de decisión (intervenir o no), intervención (con alguna estrategia de control) y evaluación de la efectividad de la intervención (Barzman et al., 2015).

Para que una especie de HCH sea considerada como plaga, su densidad debe afectar el retorno o la ganancia de una inversión en un campo productivo al reducir la cantidad y/o la calidad de un producto agrícola o forestal (Montoya-Lerma et al., 2012). En el contexto del MIP, se introdujo el concepto de Nivel de Daño Económico (NDE) para estimar la abundancia de la especie plaga capaz de producir perjuicio económico y que justifique aplicar alguna medida de control (Higley y Pedigo, 1996; Faberi et al., 2014). El NDE es un concepto que involucra parámetros económicos y biológicos y que se constituye como una herramienta fundamental para la toma de decisiones de intervención con alguna estrategia de control. Hasta el momento se han hecho pocos intentos para cuantificar los umbrales económicos de control de las HCH, debido en parte a la dificultad inherente de manipular sus poblaciones y la impredecibilidad de los ataques de las hormigas contra las plantas (Montoya-Lerma et al., 2012) (pero ver: Jiménez et al., 2021; Nuñez et al., 2020 y Souza et al., 2011).

En el marco del MIP, la posibilidad de controlar estas HCH usando métodos biológicos ha generado un gran interés en estudios que, además, involucran a sus hongos simbios (Silva et al., 2006; Folgarait et al., 2011; Bich et al., 2017; Cotazo-Calambas et al., 2022). El control biológico a través de la utilización de hongos entomopatógenos y hongos antagonistas puede ser un método alternativo al control químico, ofreciendo un control más efectivo, específico, económico y duradero (Alves, 1998; Silva y Diehl-Fleig, 1988; Busarello, 2008). Los hongos antagonistas producen efectos adversos sobre otro hongo, en este caso el hongo simbiote de la HCH, a través de la competencia por espacio, por nutrientes o a través del parasitismo (Thambugala et al., 2020). Los hongos entomopatógenos son microorganismos parásitos con la capacidad de infectar y matar a los artrópodos (Lovett y Leger, 2017). Existen hongos entomopatógenos en todas las divisiones del Reino Fungi, pero los más conocidos y utilizados como biopesticidas en la agricultura ecológica, como alternativa segura a los insecticidas químicos tóxicos, pertenecen a los géneros *Beauveria* Vuill. (familia Cordycipitaceae) y *Metarhizium* Sorokín (familia Clavicipitaceae), ambos de la división Ascomycota y orden Hypocreales (Lovett y Leger, 2017).

Para el control de HCH, la eficiencia de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. ha sido demostrada en varios trabajos sobre Attini, generando perspectivas alentadoras para el problema (Boareto y Forti, 1997; Busarello, 2008). A pesar de los resultados alentadores, existe variación en los resultados del control biológico con hongos entomopatógenos, especialmente en los ensayos sobre nidos en el campo. Esta variación está dada por el tipo de casta de HCH estudiada, la estructura de las colonias de hormigas que pueden influenciar la acción de los controladores biológicos fúngicos, y la forma de aplicación de estos agentes que puede reducir la diseminación de la enfermedad en los nidos de las HCH y, consecuentemente, la eficiencia del control (Silva y Diehl-Fleig, 1988; Oi y Pereira, 1993; Loureiro y Monteiro, 2004, 2005; Busarello, 2008; Valencia-Giraldo, 2014).

#### Poblemática de las HCH en la provincia de Misiones

La Provincia de Misiones está ubicada en el NE de Argentina, posee 29.801 kilómetros cuadrados, limita al oeste con la República del Paraguay, al norte y este con Brasil y al sur con la Provincia de Corrientes. El clima es subtropical, húmedo, sin estación seca y con precipitaciones que van desde los 1.700 mm en el sudeste hasta los 2.200 mm anuales hacia el este. La temperatura anual promedio es de 21 °C, en el invierno pueden

ocurrir heladas ocasionales, mientras que en el verano las temperaturas fácilmente sobrepasan los 32 °C. El relieve de Misiones es amesetado, aunque la erosión hídrica y eólica del macizo de Brasilia ha dado origen a numerosas sierras que caracterizan su paisaje. Sus suelos son derivados del basalto, rojos, bien drenados, ricos en hierro y aluminio. La provincia forma parte del bioma de la Mata Atlántica o Bosque Atlántico, uno de los más biodiversos y más amenazados del mundo, del que solo resta el 17 % de su extensión original (Fundación Vida Silvestre Argentina, 2023). Misiones es un territorio con uno de los mejores grados de conservación del Bosque Atlántico, aproximadamente la mitad de la superficie provincial tiene vegetación nativa en distintos grados de conservación, formando un paisaje mixto entre áreas de cultivo y bosques nativos más o menos interconectados (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación, 2022; Iezzi et al., 2022).

La economía de la Provincia de Misiones se caracteriza por su alta producción de productos derivados del sector agrícola-forestal. Al año 2018, la superficie implantada con distintas especies forestales alcanzaba una superficie de 355.086 ha, correspondiendo un 80,6 % a plantaciones del género *Pinus* L. y un 13 % a plantaciones de *Eucalyptus* L'Hér. (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2021). Dentro de las diversas problemáticas que posee este sector, revisten una significativa importancia las relacionadas con la sanidad de las forestaciones. Una de estas problemáticas son las HCH, a las cuales se dedica un gran esfuerzo a su control (De Coll, 2004; De Coll et al., 2007). Tal es así que ya en el año 1974 se declaró mediante la ley provincial N° XVI-N°5 (ex ley N° 454) a la hormiga “minera” (*Atta sexdens* L.) y “cortadora” (*Acromyrmex* spp.) como plagas de la agricultura y de obligatorio exterminio (Cámara de Representantes de la Provincia de Misiones, 2018).

A pesar de la importancia de las forestaciones de pinos y eucaliptos en la economía de la provincia de Misiones, y del impacto que tienen sobre ellas las HCH, pocos esfuerzos se han realizado hasta el momento para conocer las comunidades de HCH asociadas con estas plantaciones forestales y su interacción con los remanentes del Bosque Atlántico nativo con el que juntos configuran el paisaje provincial. Asimismo, son desconocidos para la región los niveles de daño económico, esenciales para tomar decisiones de control en el modelo del MIP, y tampoco se conoce si los ataques de HCH a las plantaciones establecidas comprometen en el largo plazo la producción de madera comercial. La única estrategia de control viable en la actualidad es el control químico, a

pesar de que la estrategia de control biológico es anhelada. Esta tesis se enfoca en explorar las problemáticas expuestas y aportar conocimiento y herramientas para el desarrollo de estrategias de manejo integrado de las HCH en las plantaciones forestales de la provincia de Misiones, así, el objetivo general de la misma es determinar la riqueza, abundancia y el umbral de daño económico de las HCH del género *Atta* sobre plantaciones de *Pinus taeda* y *Eucalyptus grandis* de la provincia de Misiones y evaluar agentes de procedencia local para su control biológico. Los objetivos específicos son seis:

- Identificar las especies de HCH presentes y determinar sus abundancias tanto en las plantaciones forestales como en el bosque nativo aledaño.
- Determinar si los hormigueros de *Atta sexdens* situados en las interfases de los parches de bosques nativos y las plantaciones forestales componen su dieta en forma diferente a aquellos hormigueros que se encuentran en el interior de dichas plantaciones.
- Determinar el nivel de daño económico de *Atta sexdens* utilizando criterios de valoración al costo de plantaciones forestales de *Pinus taeda* y *Eucalyptus grandis*.
- Determinar los efectos a largo plazo de la especie HCH más común, *Atta sexdens*, en plantaciones de *Pinus taeda* en el NE de Argentina.
- Obtener y seleccionar, en condiciones de laboratorio, un aislamiento local de hongos entomopatógenos del género *Beauveria* con potencial para el control de nidos de campo de *Atta sexdens*.
- Evaluar en condiciones controladas de laboratorio la actividad de un aislamiento local de *Beauveria* sp. formulado como polvo seco y determinar la efectividad del mismo aislamiento para el control de nidos de campo de *Atta sexdens* en formulaciones como polvo y como cebo granulado.

Este documento se organiza en seis capítulos que se ajustan a los objetivos específicos establecidos. Cada capítulo es independiente, compuesto por una introducción, los materiales y métodos aplicados, los resultados y una discusión específica. Finalmente, el documento culmina con una conclusión general que resume los hallazgos de la tesis.

## CAPÍTULO 1: Especies de HCH y abundancia de sus nidos en las forestaciones de *P. taeda*, *E. grandis* y en los parches de bosque nativo cercanos

### 1.1 INTRODUCCIÓN

Las HCH son herbívoros generalistas capaces de consumir cantidades significativas de biomasa en los alrededores de sus nidos (Swanson et al., 2019). La disponibilidad y diversidad de especies vegetales palatables, la existencia de suelo con escasa o nula cobertura al momento del vuelo nupcial, la fragmentación del paisaje o la ausencia de enemigos naturales, son algunos de los factores que pueden explicar una mayor riqueza y abundancia de especies de HCH en un ambiente en particular (Da Silva et al., 2018; Barrera et al., 2015; Montoya-Lerma et al., 2012; Meyer et al., 2009; De Almeida et al., 2008; Moutinho et al., 2003; Farji-Brener, 2001; Vasconcelos, 1997). Los bordes y áreas degradadas de los bosques naturales son los lugares donde ocurren mayores densidades de nidos de HCH en comparación con el interior de bosques mejor conservados (Dohm et al., 2011; Meyer et al., 2009; Farji-Brener, 2001). También las densidades de algunas especies de HCH, favorecidas por el suelo descubierto y arado y la ausencia de enemigos naturales, aumentan en el interior de ambientes modificados por el hombre como lo son las plantaciones y áreas de ganadería, transformándose en importantes plagas (Vieira-Neto et al., 2016; Wirth et al., 2007).

Las plantaciones forestales son el cultivo predominante en la provincia de Misiones, abarcan aproximadamente el 12 % de su territorio, siendo *P. taeda* y *E. grandis* las más implantadas. A su vez, el 54% de la superficie provincial se encuentra ocupada por vegetación nativa en distintos grados de conservación, mientras que el 34% restante lo conforman otros usos, como cultivos de yerba mate, té y ganadería (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2021; Instituto Provincial de Estadísticas y Censos, 2015). Estos componentes del paisaje provincial se encuentran intercalados, lo que resulta en una alta presencia de parches de bosque nativo adyacentes a las plantaciones forestales.

Cuando las HCH anidan en o cerca de las plantaciones, pueden volverse limitantes para la obtención de rédito económico del cultivo. Por ejemplo, entre las especies de HCH ya conocidas por ser importantes plaga se encuentran *Atta cephalotes*, *A. sexdens*, *A. laevigata* Smith, *A. capiguara* Gonçalves, *A. mexicana* Smith, *A. colombica* Guérin-Méneville, *Acromyrmex coronatus* Fabr., *Ac. landolti* Forel y *Ac. octospinosus* (Montoya-Lerma et al., 2012). En Misiones habitan por lo menos ocho especies de

HCH (Farji-Brener y Ruggiero, 1994), aunque posiblemente no todas deban ser consideradas plagas de las plantaciones forestales. A pesar de la importancia de conocer las especies a controlar para desarrollar un programa de manejo integrado de plagas, hasta la fecha, no se han realizado estudios en la región que determinen, a través de relevamientos a campo, cuáles son las especies de HCH asociadas específicamente a las plantaciones forestales. Asimismo, no se ha investigado el rol que cumplen los parches de bosque nativo dentro de las matrices forestales en relación con las comunidades de HCH. Se desconoce si efectivamente se cumple lo que los productores forestales suponen: que los parches de bosque nativo aledaños a las plantaciones son un grave problema para el manejo de las HCH, al actuar como una de las principales fuentes de reinas que invaden las plantaciones.

Con el propósito de conocer la comunidad de HCH que se establece en las plantaciones forestales del noroeste de Misiones, identificar las especies que pueden ser consideradas plagas y comprender el papel que desempeña el bosque nativo aledaño en la modulación de estas comunidades de insectos, el objetivo de este capítulo fue identificar las especies de HCH presentes y determinar sus abundancias tanto en las plantaciones forestales como en el bosque nativo aledaño.

## 1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en cinco localidades del noroeste de la Provincia de Misiones: Puerto Piray, Colonia Victoria, Puerto Libertad, Colonia Delicia y Wanda (Figura 1). Esta es la región donde se concentra la mayor superficie forestada de Misiones. En cada localidad se evaluaron cinco ambientes que componen el paisaje: una plantación juvenil y una adulta de *P. taeda*, una plantación juvenil y una adulta de *E. grandis* y un parche de bosque nativo ubicado en la proximidad de estas plantaciones (Tabla 1). Para las plantaciones forestales se consideraron dos categorías: plantaciones juveniles (plantaciones de entre cero y dos años) y plantaciones adultas (aquellas cercanas a su



Figura 1. Localidades de la Provincia de Misiones donde se evaluaron las comunidades de HCH.

turno de cosecha: *P. taeda* entre ocho y trece años y *E. grandis* entre cinco y ocho años).

Tabla 1. Ambientes evaluados para la determinación de riqueza y abundancia de HCH.

	<b>Ambiente evaluado</b>	<b>Denominación</b>
<b>1</b>	Bosque nativo aledaño	BN
<b>2</b>	Plantación juvenil de <i>P. taeda</i>	PT_J
<b>3</b>	Plantación adulta de <i>P. taeda</i>	PT_A
<b>4</b>	Plantación juvenil de <i>E. grandis</i>	EG_J
<b>5</b>	Plantación adulta de <i>E. grandis</i>	EG_A

En todos los casos, se consideraron plantaciones que estuvieron bajo un régimen de control de malezas estándar, con un tiempo mínimo desde el último control de HCH de un año. Las condiciones de selección para el bosque nativo aledaño fueron que presente características de suelo similares a los de las plantaciones de la correspondiente localidad de estudio, evitando suelos anegadizos y pedregosos. En el caso de ser bosque en fajas protectoras, que su ancho mínimo no sea menor a 100 metros. Los parches de bosque nativo en todos los casos fueron similares entre sí, son bosques que en algún momento de su historia sufrieron intervenciones de aprovechamiento, todas antes de 1994 (Arauco, 2015). En estos parches de bosque nativo no hay árboles de gran porte (superiores a 20 m de altura) característicos del Bosque Atlántico semidecuido, pero si se observa la presencia de tres estratos en la vegetación y con presencia de numerosas lianas y bambúceas. Se estableció como criterio que el parche de bosque nativo se encuentre contiguo a, por lo menos, una de las plantaciones evaluadas en cada sitio, de esta manera en la localidad de Puerto Piray el bosque nativo fue aledaño al *E. grandis* adulto, en Colonia Victoria al *P. taeda* juvenil, en Puerto Libertad al *P. taeda* juvenil y al *E. grandis* adulto, en Colonia Delicia al *P. taeda* juvenil y al *P. taeda* adulto y en Wanda el parche de bosque nativo estuvo aledaño al *P. taeda* juvenil y al *E. grandis* juvenil.

En cada ambiente, se delimitaron secciones de cinco hectáreas alejadas 20 metros de los bordes, dentro de las cuales se estableció aleatoriamente una transecta por hectárea, totalizando cinco transectas por ambiente; las medidas de las mismas fueron de 10 m de ancho por 100 m de largo. En su interior, se censaron los nidos de HCH y se registró el tamaño del montículo. De cada nido, se recolectaron al menos dos obreras de las castas

mayores que fueron depositadas en recipientes cerrados y rotulados, las cuales fueron llevadas al laboratorio para su identificación mediante claves taxonómicas.

Mediante el software R version 4.2.2 (R, 2022), se determinó el número de especies por ambiente y localidad, se calculó la abundancia para cada especie y género de HCH, definida tanto por la cantidad de nidos por hectárea como por la superficie cubierta por montículos por hectárea. Se evaluó estadísticamente el efecto de los distintos ambientes sobre las abundancias de hormigueros por especie de HCH encontrada utilizando la prueba de Kuskal-Wallis ya que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad, en los casos donde la prueba resultó significativa, se procedió a las pruebas *post hoc* de Wilcoxon.

Para analizar las diferencias a nivel de las comunidades de HCH que ocurren en cada uno de los ambientes evaluados, se utilizó el paquete *vegan* (Oksanen et al., 2022) para contrastar estadísticamente los valores con ANOSIM entre los tratamientos, los cuales se visualizaron gráficamente utilizando un NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) según la similitud de Bray-Curtis a partir de la función  $\ln(x + 1)$  para estandarizar los datos.

### 1.3 RESULTADOS

Fueron encontradas tres especies de HCH en los ambientes evaluados, *A. sexdens*, *Acromyrmex subterraneus* Forel y *Acromyrmex heyeri* Forel. El único ambiente donde estuvieron representadas las tres especies fue el de plantaciones adultas de *E. grandis*, solo allí se encontró un nido de *Ac. heyeri*, considerada entonces una especie rara dentro de estos ambientes productivos y sus bosques aledaños. *A. sexdens* fue la especie que estuvo presente en todos los ambientes y presentó la mayor abundancia en número y superficie cubierta por nidos en las plantaciones forestales. Mientras que, en el bosque nativo, *Ac. subterraneus* fue la especie con mayor cantidad de nidos por hectárea. Aunque, como los nidos de esta especie no alcanzan a desarrollar el tamaño que pueden tener los de *A. sexdens*, en superficie cubierta de nidos por hectárea, ambas especies presentaron un grado de cobertura muy similar en el bosque nativo aledaño (Figura 2).

En las plantaciones juveniles de las dos especies forestales se encontró una mayor cantidad de hormigueros, sin embargo, esos nidos fueron de reciente establecimiento, por lo tanto, los valores observados de la superficie cubierta por hectárea fueron bajos.

Lo opuesto ocurrió en las plantaciones forestales adultas, allí el número de nidos por hectárea representó el 5 % del total encontrado en las plantaciones juveniles de *P. taeda* y el 29% de las plantaciones juveniles de *E. grandis*, pero la superficie cubierta por nidos se encontró entre las mayores, principalmente en el caso de *E. grandis*.

Particularmente, las plantaciones adultas de *E. grandis* se destacaron por presentar una superficie cubierta por hormigueros muy superior a los demás ambientes evaluados (Figura 2).

La prueba de Kruskal-Wallis indicó que para la especie *A. sexdens* existen diferencias entre las abundancias en los ambientes evaluados, tanto para el número de nidos ( $\chi^2=18,483$ ; GL= 4;  $p < 0,001$ ), como para la superficie cubierta por nidos ( $\chi^2=103,44$ ; GL= 4;  $p < 0,0001$ ). Sin embargo, la misma prueba para *Ac. subterraneus* no indicó un efecto significativo de los ambientes donde esta especie estuvo presente sobre su abundancia en número de nidos por hectárea ( $\chi^2=5,0769$ ; GL= 3;  $p=0,1663$ ) ni en la superficie cubierta por sus nidos ( $\chi^2=5,2453$ ; GL= 3;  $p=0,1547$ ).

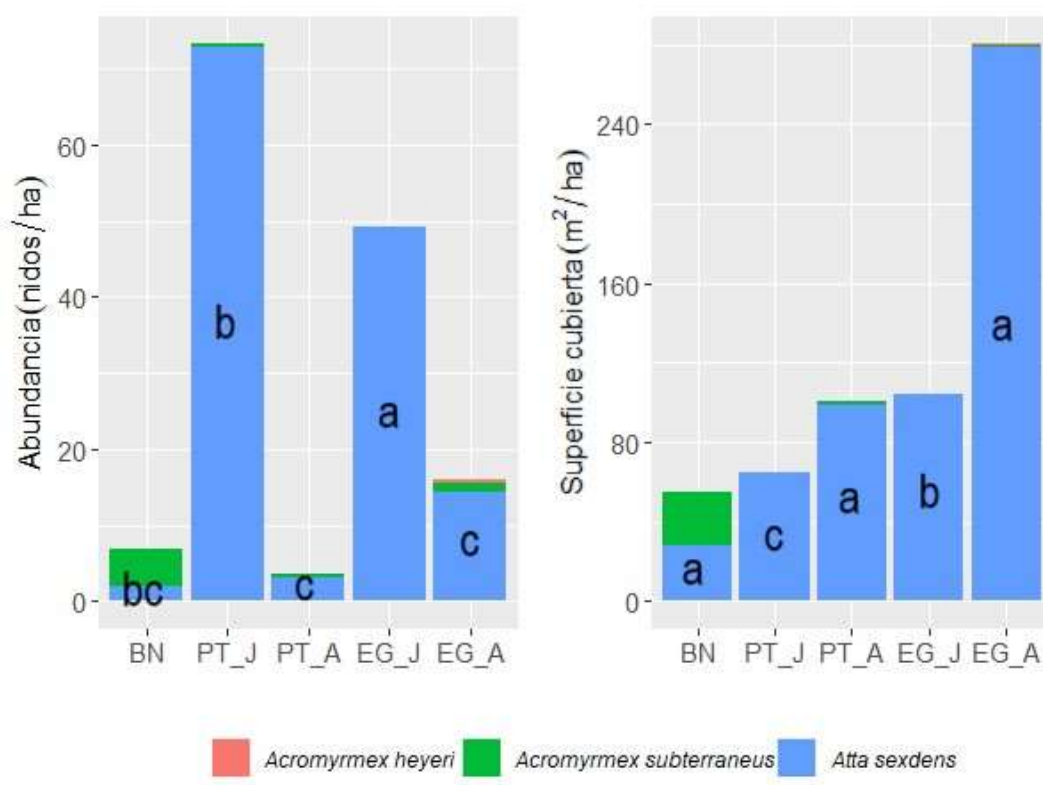


Figura 2. Abundancias de nidos y superficie cubierta de especies de HCH encontradas en distintos ambientes. Diferentes letras entre barras indican diferencias significativas en las abundancias de *A. sexdens* entre los ambientes evaluados según la prueba de a pares de Wilcoxon, las abundancias de *Ac. subterraneus* y *Ac. heyeri* no presentaron diferencias significativas entre ambientes. BN: bosque nativo aledaño, PT\_J: *P. taeda* juvenil, PT\_A: *P. taeda* adulto, EG\_J: *E. grandis* juvenil, EG\_A: *E. grandis* adulto.

El ANOSIM resultó en una solución de dos dimensiones y con bajo estrés (estrés = 0,034), es decir que casi toda la varianza de los datos está explicada por estas dos dimensiones. La Figura 3 muestra tres grupos bien definidos, con afinidades explicadas por la edad del cultivo y el tipo de cobertura del ambiente (cultivado o natural). Uno de los grupos estuvo conformado por las plantaciones juveniles de *P. taeda* y *E. grandis*, las plantaciones adultas formaron otro y los ambientes de bosque nativo aledaño formaron un grupo independiente, el cual se encuentra más próximo a las plantaciones adultas que a las juveniles. Esto sugiere que las comunidades de HCH en el bosque nativo aledaño son diferentes de las comunidades en las plantaciones de *P. taeda* y *E. grandis*, y que las comunidades en las plantaciones juveniles son más similares entre sí que las comunidades en las plantaciones adultas. A pesar de ser diferentes, la comunidad de HCH de plantaciones adultas de *E. grandis* es la más cercana a la del bosque nativo aledaño.

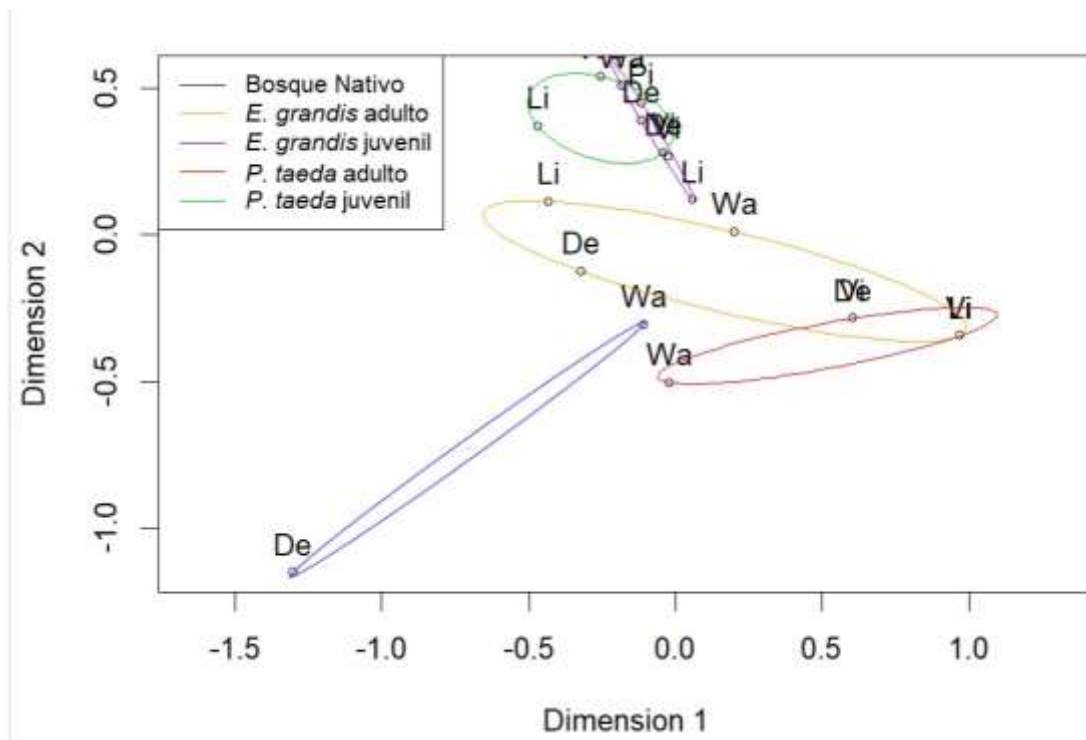


Figura 3. NMDS de las comunidades de HCH encontradas en distintos ambientes. Li: Puerto libertad, Wa: Wanda, De: Puerto Delicia, Vi: Colonia Victoria, Pi: Puerto Piray.

## 1.4 DISCUSIÓN

De las tres especies de HCH halladas en este relevamiento, *A. sexdens* se presentó como la más abundante en casi todos los ambientes evaluados, seguida por *Ac. subterraneus*. *Ac. heyeri*, en cambio, se presentó como una especie rara ya que se encontró un solo nido en todo el relevamiento en una plantación adulta de *E. grandis*. A pesar de que se ha citado la ocurrencia de estas tres especies de HCH asociadas a plantaciones forestales (Sánchez-Restrepo et al., 2019), *A. sexdens* es una de las especies de HCH más ampliamente consideradas como plaga en múltiples cultivos en el neotrópico, incluidos *P. taeda* y *E. grandis* (Montoya-Lerma et al., 2012), y, por lo tanto, es la especie de mayor interés en la región para desarrollar estrategias de manejo integrado dados los niveles poblacionales encontrados en nuestro estudio.

Las abundancias de *A. sexdens* en plantaciones adultas de *P. taeda* que encontramos en este estudio, de 3,2 nidos/ha y 98,6 m<sup>2</sup>/ha, son similares a las del relevamiento realizado por De Coll (2004) en dos plantaciones adultas de la misma especie en Misiones, quien halló abundancias entre 1,37 y 2,5 nidos/ha y de entre 86,2 y 120 m<sup>2</sup>/ha. Esta semejanza era esperada debido a que las plantaciones evaluadas por ese autor comparten características edáficas, genéticas y de manejo con las plantaciones de este estudio.

Las abundancias de *A. sexdens* encontradas en plantaciones de *E. grandis* juveniles (49,2 nidos/ha y 103,8 m<sup>2</sup>/ha) y adultas (14,4 nidos/ha y 278,8 m<sup>2</sup>/ha) son superiores a los hallados por Zanetti et al. (2000), quienes encontraron abundancias de 18,9 nidos/ha y 51 m<sup>2</sup>/ha en eucaliptos de 18 meses y de 17,1 nidos/ha y 82,3 m<sup>2</sup>/ha en plantaciones de 126 meses. En cambio, Caldeira et al. (2005) encontraron 29,3 nidos de *Atta* sp. por hectárea con una superficie cubierta promedio de 172,3 m<sup>2</sup>/ha pero que varió entre 5,2 y 408 m<sup>2</sup>/ha. La menor superficie cubierta por hormigueros del trabajo de Zanetti et al. (2000) puede ser consecuencia de que en esas plantaciones adultas se realizaron controles de HCH un año antes, a diferencia del manejo que reciben las plantaciones forestales de Argentina donde el control de hormigas se hace solo hasta el tercer año.

En el bosque nativo aledaño, *A. sexdens* presentó abundancias de 2 nidos/ha y 28 m<sup>2</sup>/ha. Nuestros valores encontrados son comparables a los encontrados en los bordes de parches de bosque nativo, también del Bosque Atlántico, por Wirth et al. (2007) y por Meyer et al. (2009). Estos autores determinaron que las mayores densidades de nidos de

HCH de los bosques nativos ocurren próximas a los bordes y rondan los 2 nidos/ha, pero en ese estudio no se especifica la superficie que cubren los mismos.

De las dos especies de HCH halladas en el bosque nativo, solo *A. sexdens* parece verse favorecida por los ambientes cultivados donde sus abundancias se incrementan considerablemente. A pesar de que en el bosque nativo aledaño no se realizan controles de HCH, es el ambiente donde se encontró la menor abundancia de nidos de la especie más voraz, *A. sexdens*. Esto, al contrario de lo que típicamente mencionan los silvicultores, indicaría que los bosques no son importantes lugares de resguardo de nidos que actúen como fuente de reinas capaces de incrementar los niveles poblacionales en las plantaciones circundantes en época de reproducción. Al menos no son más importantes que las propias plantaciones forestales, las cuales son donde se resguardan la mayor cantidad de nidos, que además tienen un mayor tamaño, y al ser más grandes, se los consideran más vigorosos y podrían tener una mayor capacidad de producción de nuevas reinas. De cualquier modo, sería necesario realizar un estudio de la dispersión de las reinas fecundadas de las HCH para poder ver cual es la principal fuente de nuevos nidos en las plantaciones.

La preferencia de las HCH por anidar en sitios con poca cobertura vegetal parece ser una razón clave detrás de la mayor cantidad de nidos en las plantaciones forestales juveniles y la menor presencia de nidos tanto en las plantaciones adultas como en el bosque nativo cercano (Montoya-Lerma et al., 2012; Vasconcelos, 1997). Las plantaciones forestales juveniles aún presentan suelo descubierto y muestran una alta densidad de nidos por hectárea, caracterizados por su tamaño más pequeño, lo que sugiere establecimientos recientes. Las plantaciones forestales adultas presentan una menor cantidad de nidos por hectárea, pero de mayor tamaño, lo que indica la presencia de nidos adultos que lograron un establecimiento exitoso en las etapas iniciales de la plantación. Por otro lado, en el interior de los parches de bosque nativo, la abundancia de nidos de *A. sexdens* es aún menor que en las áreas de cultivo, probablemente debido a la presencia constante de una mayor cobertura vegetal del suelo en estos ambientes, que actúa como un mecanismo *Bottom-up* de regulación de la dinámica de las comunidades de HCH (Urbas, 2005).

## CAPÍTULO 2: Hábitos de forrajeo de *A. sexdens* en plantaciones de *P. taeda*, *E. grandis* y en la interfase con el bosque nativo

### 2.1 INTRODUCCIÓN

La mayoría de las HCH poseen una dieta generalista, pero con preferencia por plantas que no presentan defensas químicas y mecánicas, que tengan un alto contenido nutricional y un adecuado contenido de humedad (Coley, 1983; Folgarait et al., 1996; Wirth et al., 2003). Entre las plantas que cumplen con esos criterios se encuentran las especies pioneras (*Trema micrantha* (Roem. & Schult.) Blume, *Cecropia* spp. Loefl., *Phytolacca* spp. L., *Solanum verbascifolium* L., *Piper aduncum* L.), que abundan en los bordes de los parches de bosques nativos (Urbas et al., 2007; Amaya-Hernández et al., 2019). Estas plantas son uno de los grupos de especies más elegidas por las HCH, al menos por dos razones: menor producción de defensas químicas y mayor concentración de nutrientes (Coley, 1983; Coley et al., 1985). Otro ejemplo de especies preferidas por las HCH son la mayoría de las plantas cultivadas, de las cuales, los forestales probablemente son de los más atacados (Della Lucia et al., 2014). Cuando las HCH anidan en las plantaciones pueden volverse importantes plagas de las mismas. De hecho, este grupo de hormigas es considerado como la principal plaga de las forestaciones que se desarrollan en el Neotrópico (Montoya-Lerma et al., 2012). Además de la selectividad, el volumen del forrajeo de las HCH es importante, se ha estimado que su consumo de hojas puede representar entre el 10 % y el 15 % de toda la biomasa disponible en su área de forrajeo, posicionándose como el principal herbívoro en los ecosistemas donde se distribuyen (Swanson et al., 2019).

Entre las especies de HCH con mayor capacidad de daño a los cultivos se encuentra *A. sexdens* (Montoya-Lerma et al., 2012). Se trata de una especie con marcada preferencia por dicotiledóneas (Fowler et al., 1986), aunque es muy plástica en su dieta porque en ecosistemas donde dominan las monocotiledóneas, como los campos naturales de altitud de Santa Catarina, Brasil, su dieta se compone mayoritariamente por ese grupo de plantas (Giesel et al., 2013). En Argentina, *A. sexdens* se encuentra presente en las provincias de Misiones y norte de Corrientes (Farji-Brener y Ruggiero, 1994; Sánchez-Restrepo et al., 2019), que también es la región que concentra la mayor superficie de cultivos forestales del país (Slutzky, 2016). Se ha determinado en el Capítulo 1 que esta especie presenta elevados niveles poblacionales en el interior de monocultivos de *P.*

*taeda* y *E. grandis* de Misiones, y niveles más bajos en el interior del bosque nativo aledaño.

También en los bordes de los parches, la abundancia de nidos de HCH es varias veces mayor que en el interior de los mismos (Farji-Brener, 2001; Urbas et al., 2007; Amaya-Hernández et al., 2019). En estos lugares las HCH parecen beneficiarse, además de la mayor cantidad de especies pioneras disponibles, de mejores condiciones edáficas, microclimáticas y por la escasez de enemigos naturales (Moutinho et al., 2003; De Almeida et al., 2008; Da Silva et al., 2018).

Una propuesta de manejo de las plantaciones, que cumple con los fundamentos del manejo integrado de plagas (MIP) y que algunos autores plantean, es la de configurar los cultivos en matrices que presenten una mayor diversidad de especies aprovechables por las HCH, estrategia que también se puede combinar con el uso de barreras mecánicas o químicas en las plantas cultivadas (Varón et al., 2007; Perri et al., 2021). Proponen que de esta manera se puede desviar el forrajeo de las HCH a ese recurso alternativo y que, en consecuencia, disminuya su impacto sobre los cultivos. En la región del Bosque Atlántico, es común que las plantaciones forestales se encuentren colindantes con parches de bosques nativos, por lo tanto, se presenta una oportunidad para estudiar en qué medida los nidos de HCH establecidos en esas interfases cambian la composición de su forrajeo con relación a los nidos del interior de las forestaciones donde la disponibilidad de recursos se encuentra limitada prácticamente solo al cultivo forestal.

Con el propósito de comprender cómo las HCH estructuran su dieta dentro de los monocultivos forestales en comparación con ambientes con mayor diversidad de recursos palatables, y así evaluar la viabilidad de incluir esta diversidad en las plantaciones forestales como propuesta de manejo, el objetivo de este capítulo fue determinar si los hormigueros de *A. sexdens* situados en las interfases de los parches de bosques nativos y las plantaciones forestales componen su dieta en forma diferente a aquellos hormigueros que se encuentran en el interior de dichas plantaciones. Además, se buscó describir si estas diferencias o similitudes se mantienen a lo largo de las cuatro estaciones del año.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se definieron tres tipos de ambientes, una plantación adulta de *P. taeda*, una de *E. grandis* y la interfase de alguna de estas plantaciones con parches del bosque nativo característico de la región (Bosque Atlántico). Se seleccionaron plantaciones adultas de ambas especies ya que estas no requieren de controles de HCH ni de malezas hasta el turno de cosecha. Cada uno de estos ambientes se seleccionaron en las localidades de Colonia Luján, Delicia kilómetro 8 y Delicia kilómetro 22, todas del noroeste de la Provincia de Misiones (Figura 4).



Figura 4. Localidades de la Provincia de Misiones donde se evaluó el forrajeo de *A. sexdens*.

En cada ambiente y localidad se localizaron tres hormigueros de *A. sexdens*, los hormigueros seleccionados estaban separados por lo menos por 100 metros entre sí para evitar superposiciones en sus áreas de forrajeo. Cada nido fue geoposicionado mediante punto GPS y señalado con cartelería. De esta manera, el estudio se realizó sobre un total de 27 hormigueros, nueve nidos en cada ambiente. En Colonia Luján, dos de los nidos correspondientes a la interfase de las plantaciones con el bosque nativo eran colindantes a *P. taeda* y uno a *E. grandis*, mientras que en las localidades de Delicia kilómetro 8 y de Delicia kilómetro 22 dos nidos eran colindantes a *E. grandis* y uno a *P. taeda*.

Cada tres meses y durante dos años, se realizaron las evaluaciones que consistieron en la recolección durante 20 minutos en horario de pleno forrajeo, de todo el material vegetal acarreado por las obreras hacia los nidos. El material fue recolectado con pinza y depositado en recipientes plásticos cerrados, rotulados y almacenados en ambiente fresco para evitar su deshidratación. En laboratorio, el material fue clasificado en cinco grandes grupos (forestal, dicotiledóneas, monocotiledóneas, pteridófitas y otros) según el tipo vegetal, y estado (fresco o seco) dado que se ha observado que las HCH forrajejan material senescente recolectado del suelo (Tabla 2). Luego se colocó el material rotulado en bolsas de papel madera que fueron llevados a estufa para su secado a 60 °C hasta lograr peso constante (48 h aproximadamente), momento en que se pesaron las muestras.

Tabla 1. Clasificación del material, por tipo y estado, acarreado por las colonias de *A. sexdens* localizadas en las plantaciones de *P. taeda* y *E. grandis* y en las interfases con el bosque nativo.

<b>Tipo y estado del material recolectado</b>	<b>Denominación</b>
Forestal fresco	fo-f
Forestal seco	fo-s
Dicotiledóneas fresco	di-f
Dicotiledóneas seco	di-s
Monocotiledóneas fresco	mo-f
Monocotiledóneas seco	mo-s
Pteridófitas fresco	pt-f
Pteridófitas seco	pt-s
Otro fresco	ot-f
Otro seco	ot-s

Los datos fueron analizados y graficados en la versión 4.2.2 de R (R, 2022). Se ajustaron modelos lineales mixtos con el paquete *lme4* (Bates et al., 2011), considerando el ambiente, el tipo y estado del material, la estación del año de evaluación y sus correspondientes interacciones como factores fijos; y el año de evaluación y la localidad como factores aleatorios. Cuando los factores resultaron significativos, se realizaron pruebas *post hoc* con *emmeans* (Lenth, 2022) y *multcomp* (Hothorn et al., 2008) corrigiendo los p-valores con el método de Bonferroni.

## 2.3 RESULTADOS

Se encontró evidencia de que *A. sexdens* modifica la composición de su dieta en función de la disponibilidad de recursos que existen en el ambiente donde están establecidos sus nidos, tanto considerando la variable número de elementos forrajeados (GL=10; F= 4,92;  $p < 0,0001$ ), como la variable peso seco (GL=10; F= 4,26;  $p < 0,0001$ ). Estas diferencias en el forrajeo fueron estadísticamente significativas entre ambientes en las categorías de material forestal fresco y en dicotiledóneas fresco, mientras que en las demás categorías el forrajeo no presentó diferencias (Figuras 5 y 6).

En los nidos del interior de las plantaciones de *P. taeda* y *E. grandis* la categoría de material con mayor forrajeo fue el forestal fresco, la cual representó respectivamente el

78-77 % y el 68-78 % del total de elementos acarreados (número de elementos-peso seco), seguido por el forestal seco y dicotiledóneas frescas en las plantaciones de pinos, y por dicotiledóneas frescas seguido por forestal seco en los nidos en plantaciones de eucaliptos.

En los nidos situados en la interfase de las plantaciones forestales con el bosque nativo, las categorías más acarreadas también fueron las de forestal fresco y la de dicotiledóneas frescas, pero en proporciones muy similares. Considerando el número de elementos, las dicotiledóneas frescas representaron el 41 % del total y el forestal fresco el 39 %. En la variable peso seco estos porcentajes fueron del 35 % y 45 % respectivamente (Figuras 5 y 6).

Las categorías menos frecuentes en los tres ambientes fueron las de pteridófitas y monocotiledóneas ya sea en estado fresco como seco, representando individualmente menos del 3,3 % de la dieta. También tuvo una baja participación la categoría de dicotiledóneas secas, especialmente en la variable peso seco (Figuras 5 y 6).

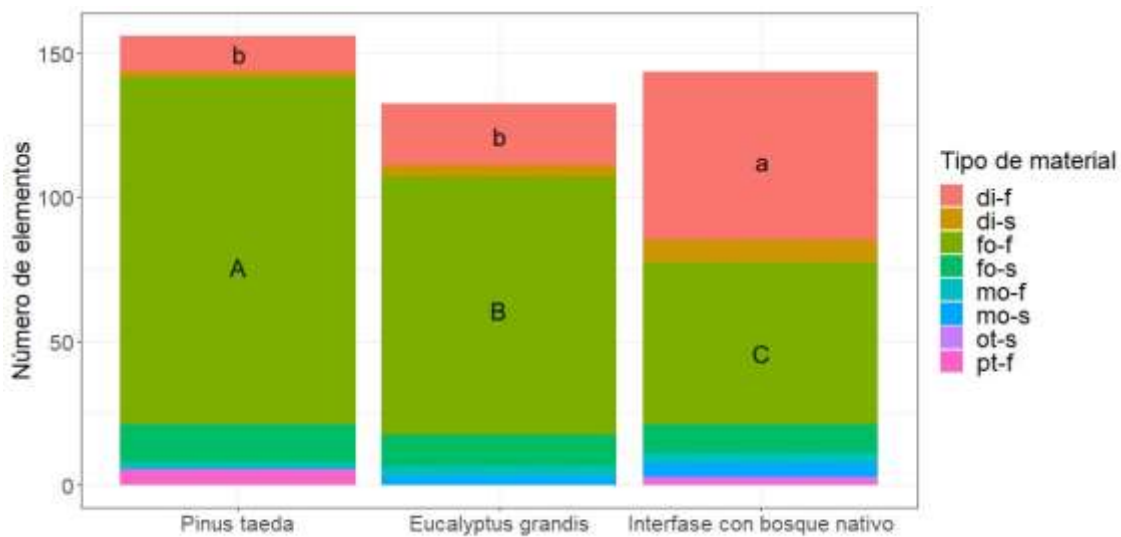


Figura 5. Número de elementos acarreados en 20 minutos por nido de *A. sexdens* en tres ambientes evaluados durante las cuatro estaciones del año. Segmentos de barra marcados con letras distintas resultaron significativamente diferentes entre sí en las comparaciones *post hoc* de a pares del mismo tipo y estado del material con corrección de los p-valores con el método de Bonferroni, las comparaciones de los segmentos sin letras agregadas resultaron no significativas.

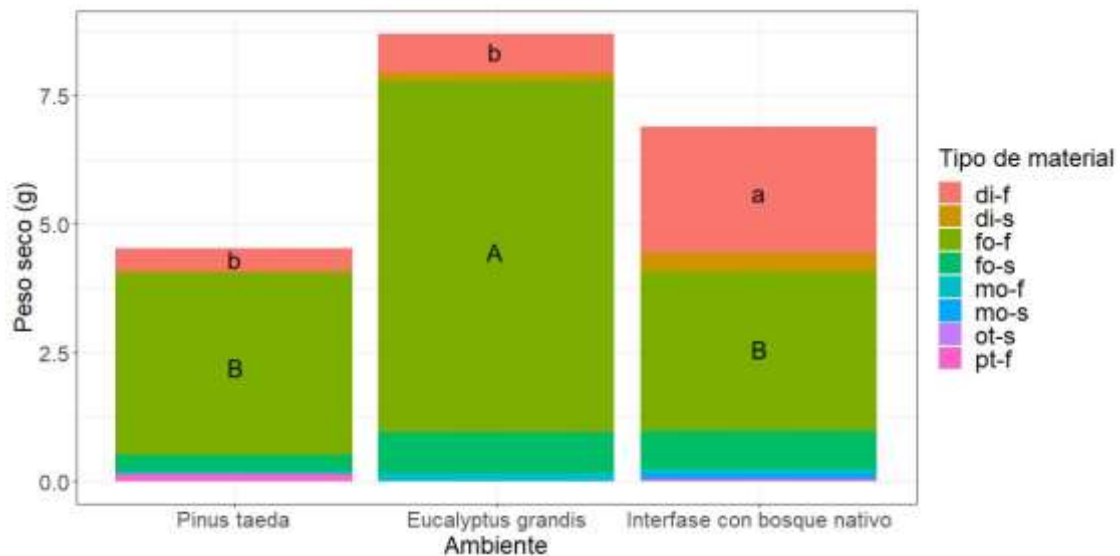


Figura 6. Peso seco promedio de elementos acarreados en 20 minutos por nido de *A. sexdens* en tres ambientes evaluados. Segmentos de barra marcados con letras distintas resultaron significativamente diferentes entre sí en las comparaciones *post hoc* de a pares del mismo tipo y estado del material con corrección de los p-valores con el método de Bonferroni, las comparaciones de los segmentos sin letras agregadas resultaron no significativas.

No fueron significativos los efectos de la estacionalidad del forrajeo total de *A. sexdens*, sin diferenciar por ambiente ni tipo de material, ya sea en número de elementos (GL: 3;  $F=0,28$ ;  $p=0,8362$ ) como en peso seco (GL: 3;  $F=0,1$ ;  $p=0,9616$ ). Sin embargo, al separar por tipo de material y estado, se encontraron diferencias entre los ambientes en las distintas estaciones del año, esto ocurrió con el número de elementos (GL: 7;  $F=81,1$ ;  $p<0,0001$ ) y el peso seco (GL: 7;  $F=60,4$ ;  $p<0,0001$ ). En las figuras 7 y 8 se muestran las comparaciones que resultaron diferentes entre ambientes y estación

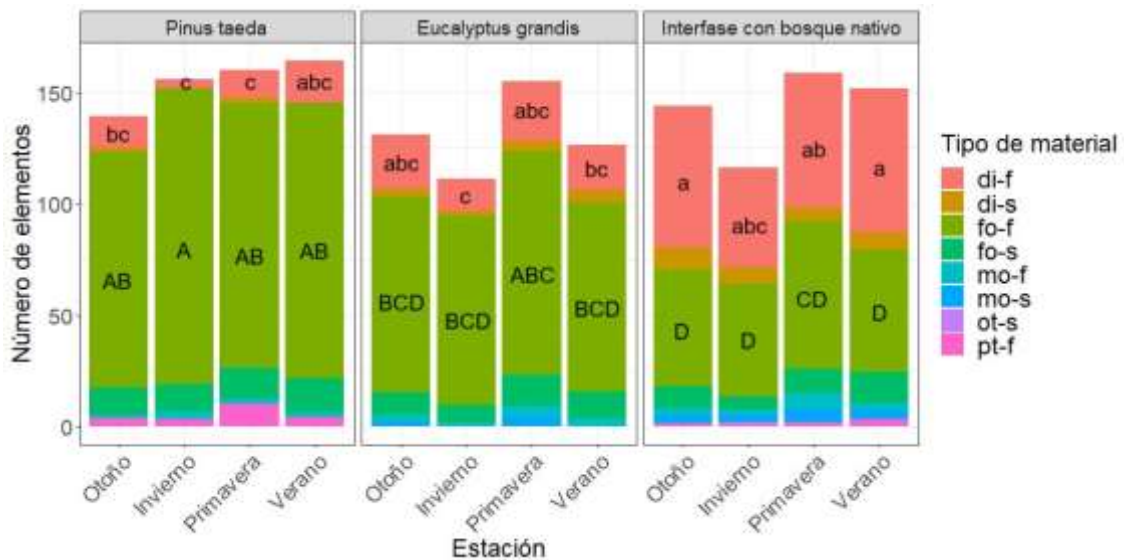


Figura 7. Número promedio de elementos acarreados en 20 minutos por nido de *A. sexdens* en tres ambientes evaluados durante las cuatro estaciones del año. Segmentos de barra marcados con letras distintas resultaron significativamente diferentes entre sí en las comparaciones *post hoc* de a pares del mismo tipo y estado del material con corrección de los p-valores con el método de Bonferroni, las comparaciones de los segmentos sin letras agregadas resultaron no significativas.

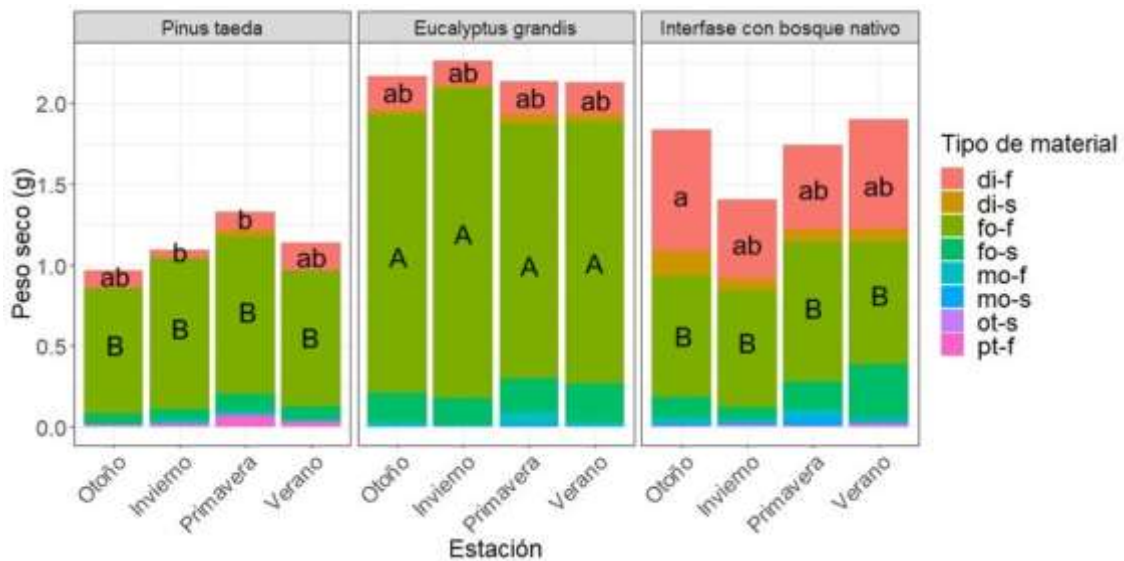


Figura 8. Peso seco (g) promedio de los elementos acarreados en 20 minutos por nido de *A. sexdens* en tres ambientes evaluados durante las cuatro estaciones del año. Segmentos de barra marcados con letras distintas resultaron significativamente diferentes entre sí en las comparaciones *post hoc* de a pares del mismo tipo y estado del material con corrección de los p-valores con el método de Bonferroni, las comparaciones de los segmentos sin letras agregadas resultaron no significativas.

## 2.4 DISCUSIÓN

Encontramos que los nidos de *A. sexdens* del interior de las plantaciones forestales componen su dieta en proporciones diferentes a los que se encuentran en la interfase con el bosque nativo. Hormigueros de la interfase con el bosque nativo forrajea un mayor número y peso de material no cultivado (hojas frescas de dicotiledóneas) y un menor número y peso de material forestal fresco proveniente del cultivo, a comparación de aquellos hormigueros que se encontraban en el interior del monocultivo. Este es el primer estudio que compara la composición de la dieta de nidos de *A. sexdens* situados en el interior de los cultivos forestales con respecto a los localizados en su interfase con vegetaciones naturales.

En el interior de las plantaciones el material forestal fresco fue la categoría más forrajada, y representó entre el 68 y el 78 % del total. En los nidos de la interfase, la proporción de material forestal fresco disminuyó y representó entre el 39 y el 45 % del total forrajado, los hormigueros de la interfase reemplazaron el consumo de material forestal fresco por dicotiledóneas frescas. Esta diferencia en la composición de la dieta de *A. sexdens* puede deberse a la mayor disponibilidad de especies palatables que ocurre en la interfase de las forestaciones con el bosque nativo (Urbas et al., 2007; Amaya-Hernández et al., 2019). Además de que los hormigueros de la interfase con el bosque nativo atacan menos a las plantaciones, sus densidades en el interior del bosque son menores que en las mismas (Capítulo 1).

Como la simplificación del paisaje debido a la pérdida de los ambientes naturales por los monocultivos, pueden llevar a una mayor presión de herbivoría por plagas (Balzan et al., 2016), nuestros resultados sugieren que realizar un manejo de plantaciones forestales que incorpore una mayor diversidad vegetal palatable, como son las especies pioneras, puede ser un método viable para disminuir los ataques de HCH sobre las especies forestales. Un caso donde se observó esto, es un estudio del daño de *A. cephalotes* sobre cafetales de Colombia, donde se encontró que en el monocultivo convencional el 40% de la dieta de esa especie de HCH estuvo constituida por hojas del cultivo de café, mientras que, en los cultivos con una mayor diversidad vegetal, el café solo representó el 10% de la dieta (Varón et al., 2007). Otro caso es el trabajo de Perri et al. (2021), quienes evaluaron por primera vez una estrategia *Push-pull* (combinación de estímulos de repelencia y atracción) para el manejo de HCH. Al igual que en nuestro

caso, los resultados mostraron que las hormigas atacan menos a las plantas cultivadas cuando tienen acceso a recursos vegetales alternativos (vegetación espontánea) en su área de forrajeo en comparación con un monocultivo convencional. Sin embargo, esta diferencia encontrada por Perri y coautores fue significativa solo en el tratamiento que combinó el recurso alternativo como estímulo de atracción junto con el estímulo de repelencia (usando una barrera mecánica impregnada con un repelente químico). Los tratamientos que solo utilizaron alguno de los estímulos de manera independiente no resultaron eficaces en la reducción de los ataques de HCH a las plantas cultivadas. De todos modos, más investigaciones deberían desarrollarse en nuestro sistema de estudio para identificar las especies nativas que son más preferidas que las cultivadas, con potencial de ser usadas para incorporar a los cultivos forestales como alternativa de forrajeo. También, es necesario evaluar si la disminución del forrajeo sobre los cultivos de los nidos de la interfase se mantiene a pesar del aumento de hormigueros que ocurre en los bordes de las plantaciones forestales a comparación del interior de las mismas, según lo reportado por Ramos et al. (2008).

La dieta de *A. sexdens* en los ambientes evaluados en este estudio no presentó una estacionalidad marcada, ya que las proporciones y las cantidades del material forrajado se mantuvieron similares durante las cuatro estaciones del año. En algunos casos, se observaron diferencias de forrajeo estacional entre ambientes, pero no entre estaciones dentro de cada ambiente. Estos resultados coinciden con los de Giesel et al. (2013) quienes informaron que la actividad de nidos de *A. sexdens* en campos naturales de altitud del sur de Brasil no varió estacionalmente.

Por otro lado, con otra especie y en otra ecorregión, Sabattini (2019) encontró una estacionalidad contrapuesta del forrajeo de *Atta vollenweiderii* Forel. en dos pastizales de la provincia de Entre Ríos, Argentina. En uno de los pastizales el forrajeo fue mayor entre el otoño y el invierno, mientras en el otro, el pico de consumo ocurrió durante la primavera y el verano. A diferencia con lo constatado en este trabajo, los resultados de Sabattini (2019) indicaron que las proporciones por tipo de material forrajado por *A. vollenweiderii* cambió en las estaciones del año. En las estaciones de verano, otoño e invierno la mayor proporción consumida correspondió a las monocotiledóneas, mientras que en la primavera el mayor consumo estuvo representado por las dicotiledóneas herbáceas y arbustivas.

La falta de estacionalidad en el forrajeo de *A. sexdens* encontrada en nuestro estudio, puede ser por causa del clima de la provincia de Misiones. En esta región, no hay estación seca y todos los meses del año presentan temperatura y humedad media dentro del rango favorable para la actividad de las HCH, salvo excepciones puntuales como días con heladas o de abundantes precipitaciones. Creemos que estas condiciones permiten a las HCH estar activas durante todos los meses del año, lo que podría disminuir la probabilidad de mostrar estacionalidad en su forrajeo.

Los resultados de este capítulo proporcionan una comprensión más profunda del efecto que tiene en áreas cultivadas una mayor diversidad de recursos palatables para las HCH. La evidencia encontrada, que muestra una reducción significativa en el consumo de plantas cultivadas, plantea la necesidad de reconsiderar el modo en que se realizan las plantaciones forestales. La incorporación de diversidad vegetal a nivel de rodal y paisaje puede ser una estrategia viable para reducir los daños que producen las HCH sobre las plantaciones. Sin embargo, es fundamental determinar previamente en la región de estudio si el aumento en la abundancia de nidos de HCH en las interfases resulta en un nivel de daño sobre las plantaciones que anule o revierta los beneficios de la reducción del forrajeo individual.

### CAPÍTULO 3: Nivel de daño económico de *A. sexdens* en plantaciones menores a dos años de *P. taeda* y de *E. grandis*

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Las HCH constituyen el principal grupo de plagas que atacan a las plantaciones forestales en el neotrópico y su manejo puede implicar hasta el 30 % del total de los gastos a los que se incurren para lograr el establecimiento de tales plantaciones (Della Lucía et al., 2014). Los daños más importantes suceden en las etapas iniciales de los cultivos forestales por causa de la mayor vulnerabilidad que tienen las plantas juveniles (Zanetti et al., 2014), pero también se dan en todo el ciclo (Scherf et al., 2022a; Souza et al., 2011). Los productores forestales necesitan contar con herramientas que les permitan tomar a tiempo la decisión de controlar las HCH de modo de no comprometer la rentabilidad económica del cultivo, ni de dañar irreversiblemente las poblaciones de estos insectos nativos.

En cultivos forestales, los productores buscan certificar sus procesos productivos ante distintas organizaciones para demostrar que son sustentables, ya que los principales mercados globales demandan este tipo de productos. En la Argentina, las organizaciones más elegidas son el Forest Stewardship Council (FSC) y el Programme for the Endorsement of Forest Certification (PEFC) por medio del Sistema Argentino de Certificación Forestal (CERFOAR). Todas ellas exigen el establecimiento de programas de manejo integrado de las distintas plagas que afectan a los cultivos, entre ellos de las HCH, y a la vez regulan y limitan el uso de ciertos compuestos usados para el control químico por su peligrosidad para la salud y el ambiente (como lo son el clorpirifós, la sulfluramida y el fipronil).

Una de las pautas del enfoque del manejo integrado de plagas (MIP), es que la decisión de realizar acciones de control de un determinado organismo esté basada en niveles económicos (Smith y Reynolds, 1965). La principal herramienta de toma de decisiones alineada a ese enfoque es el nivel de daño de económico (NDE), que se define como la densidad mínima de población de plaga que puede causar daño económico y no depende sólo de parámetros económicos como el costo de control, o valor de mercado del cultivo, sino también de parámetros biológicos como el estado de desarrollo del cultivo o del insecto, entre otros (Stern et al., 1959). Operativamente, cuando el silvicultor realiza relevamientos de nidos de HCH en un lote y determina que la densidad de nidos

es superior al NDE, sabrá que tiene que tomar la decisión de realizar controles, debido a que el costo del control será menor al costo del daño que están produciendo esos hormigueros. Como toda acción de control tiene un tiempo de demora en ejecutarse y en surtir efectos, existe el concepto de umbral de acción o umbral de daño económico (UDE), el cual representa la densidad específica de la plaga en la cual se debe tomar la decisión de realizar un control, para que cuando el mismo surta efectos, no se haya alcanzado al NDE (Stern et al., 1959). Por lo tanto, el UDE siempre es una densidad menor que la del NDE, y su valor específico dependerá de la situación particular del modelo de trabajo del silvicultor, principalmente de su capacidad logística en el caso de los silvicultores de Misiones.

Con respecto a las HCH, existen pocos trabajos que determinen el NDE en plantaciones forestales (pero ver: Jiménez et al., 2021; Nuñez et al., 2020 y Souza et al., 2011), probablemente por la complejidad del sistema cultivo-plaga. Una de dichas complejidades es la de poder proyectar las pérdidas de producto comercial (madera) al final del ciclo, originada por los daños en etapas tempranas. Una forma de abordar esta dificultad es determinar el daño económico que las HCH causan sobre las plantaciones juveniles en términos de valores referidos al costo de una implantación, en lugar de intentar estimar la pérdida de producto comercial al final del ciclo forestal. Estimar las pérdidas hasta el final del ciclo puede variar considerablemente debido a los efectos ambientales a lo largo de los años que dura el ciclo forestal. Hasta el momento, esta alternativa para la determinación del NDE no ha sido explorada. Por ello, en este capítulo se propone determinar el NDE de la especie de HCH más importante de Misiones, *A. sexdens*, utilizando criterios de valoración al costo de implantaciones forestales de *P. taeda* y *E. grandis*.

### 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr determinar el nivel de daño económico de *A. sexdens* en *P. taeda* y *E. grandis*, se establecieron dos experimentos para cada especie forestal. El primero tuvo como objetivo determinar cuál es el porcentaje de defoliación en las plantaciones a partir del cual se producen pérdidas económicas iguales al costo del control de las HCH, en otras palabras, el daño económico. Esto se realizó con un experimento de defoliación artificial, simulando la defoliación producida naturalmente por las HCH. El segundo

experimento, con parcelas circulares, se realizó para poder determinar cuál es la abundancia de nidos de *A. sexdens* que alcanza a producir el daño económico determinado en el primer experimento, es decir, el nivel de daño económico (NDE).

### 3.2.1 Efecto de las intensidades de defoliación sobre la mortalidad y el crecimiento *P. taeda* y *E. grandis*

En un lote en la localidad de Montecarlo, Misiones, Argentina, con suelos rojos y profundos y control total de nidos de HCH en el lote y alrededores, se procedió a la implantación de dos rodales forestales de aproximadamente 3.000 m<sup>2</sup>. En uno de los rodales se implantaron plantines de *P. taeda* y en el otro, plantines de *E. grandis*. Los plantines tenían alrededor de seis meses de viverización, aproximadamente 30 cm de altura y 1 cm de diámetro del cuello. En cada caso la distancia de plantación fue de 3 m entre filas y 2 m entre plantas (Figura 9). Tras la implantación, con el fin de evitar la herbivoría por cualquier tipo de insectos, las plantas de los dos rodales fueron pulverizadas con alfacipermetrina 6 % (Fendona 6SC®), un insecticida y efectivo repelente con poder residual. Cada 45 días aproximadamente se repetía la aplicación para mantener su efectividad. En la zona donde se realizó el experimento no hay otros herbívoros que afectan los plantines.

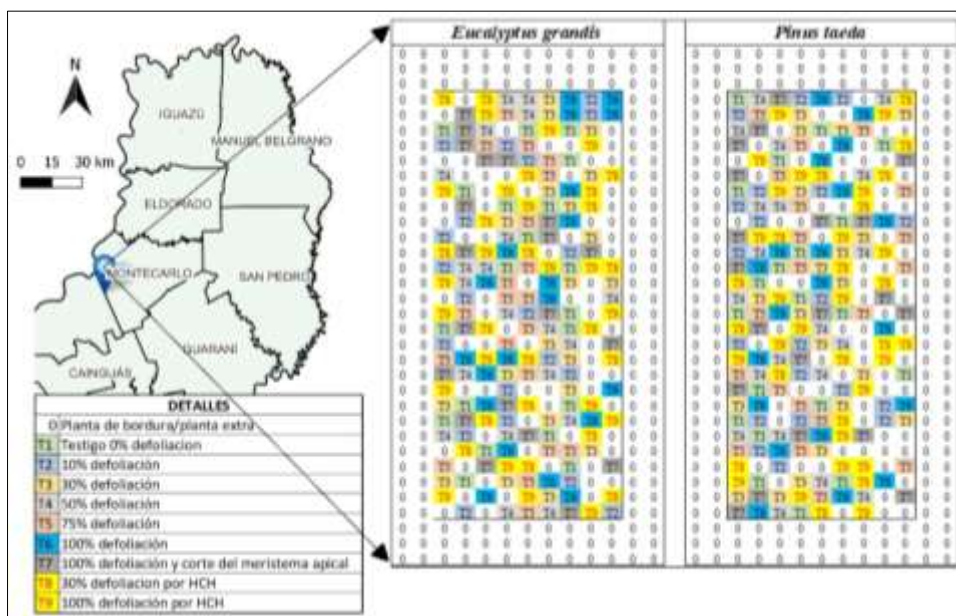


Figura 9. Croquis de la ubicación geográfica del ensayo y de la ubicación de los tratamientos dentro de cada ensayo con diseño completamente aleatorizado.

A los 90 días de establecidas las plantaciones, se procedió a la ejecución de los tratamientos que consistieron en distintas intensidades de defoliación de las plantas (Tabla 3). El diseño experimental del ensayo fue completamente aleatorio, con 20 repeticiones (plantas) por tratamiento.

Tabla 2. Descripción de los tratamientos del ensayo de intensidades de defoliación

<b>Tratamiento</b>	<b>Porcentaje de defoliación</b>
T1	0 % (Control)
T2	10 %
T3	30 %
T4	50 %
T5	75 %
T6	100 %
T7	100 % con corte de meristema apical

La defoliación artificial de las plantas se realizó con tijeras, simulando el corte natural de las HCH, que típicamente comienzan a defoliar los plantines de *Eucalyptus* desde el ápice y progresivamente descienden hacia las hojas basales, en cambio, cuando defolian plantines de *Pinus*, comienzan desde las acículas basales y suben hacia las apicales (Cantarelli, 2008; Nickele et al., 2012; observ. pers.). Por eso, para realizar los tratamientos en las plantas de *E. grandis*, se realizó primero el conteo del número total de hojas y luego se cortó el porcentaje correspondiente al tratamiento, en forma descendiente comenzando por las hojas apicales. En el caso de *P. taeda*, se midió la longitud del tallo principal y de las ramas con acículas, y se procedió al corte de las acículas en la longitud correspondiente al porcentaje de defoliación del tratamiento, comenzando por las acículas de la base y subiendo hacia el ápice (Figura 10).

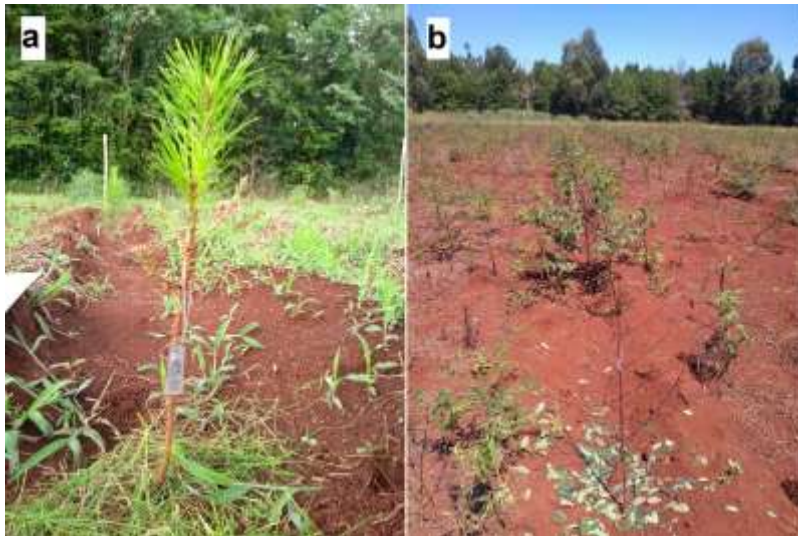


Figura 10. Detalle de la defoliación simulada con tijeras. a) Planta juvenil de *P. taeda* con un nivel de defoliación del 75 % (T5). b) Planta juvenil de *E. grandis* con un nivel de defoliación del 100 % con corte del meristema apical (T7).

Las evaluaciones se realizaron justo al momento de realizar los tratamientos (evaluación cero) y posteriormente cada 60 días, totalizando 11 evaluaciones en *P. taeda* (20 meses de mediciones) y ocho evaluaciones en *E. grandis* (16 meses de mediciones). Se realizaron menos evaluaciones en *E. grandis* por causa de una intensa helada y posterior tormenta que afectó a las plantas, por lo cual se decidió suspender las mediciones de forma anticipada. En cada evaluación, se midió el diámetro a la altura del cuello (DAC) de las plantas, la altura total (HT), y la sobrevivencia.

El experimento fue analizado sobre dos aspectos principales, el primero corresponde a la mortalidad, comparando la sobrevivencia de las plantas por tratamiento durante las evaluaciones. Las funciones de sobrevivencia por tratamiento fueron calculadas y graficadas mediante el estimador no paramétrico Kaplan-Meier, utilizando los paquetes *survival* (Therneau, 2023) y *survminer* (Kassambara et al., 2021) del software R version 4.2.2 (R, 2022). El segundo aspecto, fue analizar el crecimiento de las plantas en altura, diámetro e índice de volumen del tallo según la ecuación  $IV = HT * DAC^2$  adaptado a partir del índice de productividad de Cantarelli (2005), durante todo el periodo de evaluación de los experimentos. Para este análisis del crecimiento, se ajustaron modelos de medidas repetidas en el tiempo utilizando modelos lineales de efectos mixtos con el paquete *nlme* (Pinheiro et al., 2022) del software R versión 4.2.2 (R, 2022). Los tratamientos y el tiempo fueron considerados como variables de efectos fijos, y la repetición (planta) como variable de efecto aleatorio. Luego de constatar la significancia

estadística de la parte fija de los efectos, se realizaron contrastes entre los tratamientos utilizando el paquete *emmeans* (Lenth, 2022).

### 3.2.2 Validación de los tratamientos con defoliación real de HCH

Con el objetivo de determinar si la defoliación simulada con tijera es comparable con la real producida por HCH, se incluyeron dos tratamientos de defoliación real adicionales al ensayo. Para ello, se ofrecieron 40 plantines tanto de *P. taeda* como de *E. grandis* a un hormiguero de *A. sexdens*. Cuando 20 plantas de cada especie estuvieron defoliadas aproximadamente al 30 % y las otras 20 defoliadas al 100 %, fueron retiradas del alcance de las HCH, rociadas con Fendona 6SC® e implantadas en el sitio del experimento, siguiendo idéntica metodología de las evaluaciones que las plantas con defoliación simulada. La defoliación real por HCH, al nivel del 30 % fue considerada como tratamiento 8 (T8) y al 100 % como tratamiento 9 (T9), y fueron comparados con los tratamientos equivalentes de defoliación simulada, es decir, que T8 se comparó con T3 y T9 con T6. Estas comparaciones se realizaron de la misma forma estadística descrita en la sección 3.2.1, y los p-valores fueron corregidos por el método de Bonferroni para reducir la probabilidad de cometer un error del tipo I.

### 3.2.3 Determinación del nivel económico de defoliación

En sentido práctico, consideramos al nivel económico de defoliación como el porcentaje de defoliación sobre una plantación a partir del cual se producen pérdidas económicas, por mortalidad y disminución del crecimiento de las plantas, que son iguales al costo del control de las HCH. Para poder determinarlo, en primer lugar, se tomaron los resultados del experimento de defoliación artificial y se elaboró un índice de pérdida de plantas (IPP) para cada nivel de defoliación. El IPP integra la mortalidad de plantas y la pérdida del crecimiento volumétrico de cada nivel de defoliación respecto al control sin defoliar, que se obtuvo como resultado en la última evaluación en la sección 3.2.1 (Ecuación 1).

Ecuación 1. Cálculo del índice de pérdida de plantas de cada tratamiento.

$IPPtn (\%) = Mtn (\%) + \frac{IVt1 - IVtn}{IVt1} * 100$	<p><u>Donde:</u></p> <p><i>IPPtn</i>: Índice de pérdida de plantas del tratamiento <i>n</i>.</p> <p><i>Mtn</i>: Mortalidad del tratamiento <i>n</i>.</p> <p><i>IVt1</i>: Índice de volumen del tratamiento 1 (control)</p> <p><i>IVtn</i>: Índice de volumen del tratamiento <i>n</i>.</p>
--	--

Los valores obtenidos del IPP, fueron transformados a valores monetarios para cuantificar la pérdida económica (PE) por hectárea de cada nivel de defoliación (Ecuación 2). Se siguieron los criterios de la valoración al costo de masas forestales, sin incluir el valor del suelo, ya que es uno de los métodos más apropiados para realizar una valoración dentro de las etapas iniciales de una plantación forestal y, además; es muy preciso por estar relacionado directamente a los costos que se incurren para lograr una plantación (Justo, 1979). El costo de la plantación lograda (CP) de las dos especies forestales fue tomado de la última publicación disponible del boletín de costos forestales del Colegio de Ingenieros Forestales de la Provincia de Misiones (Colegio de Ingenieros Forestales de Misiones, 2022). Luego fueron convertidos a dólares estadounidenses, considerando la tasa de cambio oficial del Banco de la Nación Argentina vigente a la fecha de la publicación del boletín (166,60 AR\$/USD).

Ecuación 2. Cálculo de la pérdida económica producida por cada tratamiento.

$PEtn \left( \frac{\$}{ha} \right) = IPPtn (\%) * CP \left( \frac{\$}{ha} \right)$	<p><u>Donde:</u></p> <p><i>PEtn</i>: Pérdida económica producida por el tratamiento <i>n</i>.</p> <p><i>IPPtn</i>: Índice de pérdida de plantas del tratamiento <i>n</i>.</p> <p><i>CP</i>: costo de la plantación lograda.</p>
--	---

Por otro lado, el costo de control de HCH fue obtenido del relevamiento realizado por Egolf et al. (2022) correspondiente a la región de Misiones y norte de Corrientes.

Finalmente, se ajustó un modelo de regresión lineal simple entre el daño económico causado por cada tratamiento (es decir, *PEtn*) y el nivel de defoliación (los niveles de defoliación utilizados para la regresión fueron: 0 %, 10 %, 30 %, 50 %, 75 % y 100 %).

Se reemplazó, en el modelo de regresión ajustado para cada especie forestal, el valor del daño económico por el valor del costo de control de las HCH y de esta manera se obtuvo el porcentaje de defoliación a partir del cual se producen daños económicos, al que denominamos nivel económico de defoliación.

### 3.2.4 Determinación del nivel de daño económico de *A. sexdens* en plantaciones recientes de *P. taeda* y *E. grandis*

Se realizaron censos de hormigueros de *A. sexdens* en distintos lotes de dos localidades de la Provincia de Misiones (Figura 11), previamente al establecimiento de plantaciones de *P. taeda* y *E. grandis*, hasta localizar ocho en total, cuatro hormigueros para cada especie forestal. Como requisito para formar parte del experimento, estos hormigueros debían estar distanciados entre sí por al menos 200 m, y a más de 60 m de los bordes de las plantaciones. Los nidos que no cumplían con estas condiciones, fueron marcados

provisoriamente y posteriormente eliminados con cebos granulados. Los que cumplieron, fueron marcados con una estaca de madera en el centro de su montículo y se informó a los responsables de las plantaciones que no realicen ningún tipo de actividad de control sobre los mismos durante la duración del experimento.

Tomando los hormigueros seleccionados como nidos focales, alrededor de cada uno se estableció una parcela circular de una hectárea de superficie, midiendo un radio de 56,4 m a partir de la estaca central. Cada planta del interior de estas parcelas circulares fue evaluada a los 3, 15 y 30 días posteriores a la plantación del lote. Las evaluaciones consistieron en clasificar cada planta de la parcela según las clases de daño expuestas en la Tabla 4. Se mantuvo la identidad de las plantas en cada evaluación.

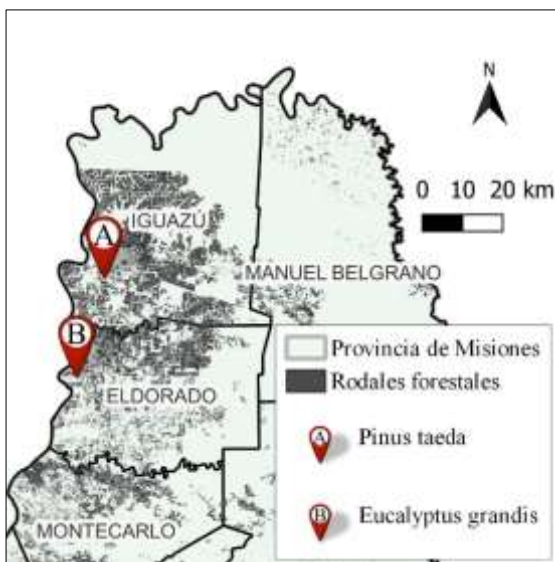


Figura 11. Ubicación geográfica de los lotes donde se instalaron las parcelas circulares para la determinación del daño producido por *A. sexdens* en plantaciones recientes de *P. taeda* y *E. grandis*.

Tabla 3. Clases de daño utilizadas para caracterizar el ataque de *A. sexdens* sobre plantaciones recientes de *P. taeda* y *E. grandis*. Adaptado de Nickele (2007).

Clase de daño	Descripción
<b>C-0</b>	Sin daño
<b>C-1</b>	Defoliación de 1 a 30 %
<b>C-2</b>	Defoliación de 31 a 50 %
<b>C-3</b>	Defoliación de 51 a 99 %
<b>C-4</b>	Defoliación del 100 % con corte apical
<b>C-5</b>	Muerto por ataque de HCH
<b>C-6</b>	Muerto por otro motivo
<b>C-7</b>	Atacadas por HCH que rebrotaron

Cada parcela circular de una hectárea fue dividida en cuatro cuadrantes mediante ejes cartesianos con punto central en la estaca focal, con el eje *y* paralelo a las filas de plantación y eje *x* transversal a las mismas. De este modo, conociendo la posición de cada planta en su respectiva fila de plantación, fue posible calcular la distancia de cada planta al nido o foco de la parcela (Figura 12).

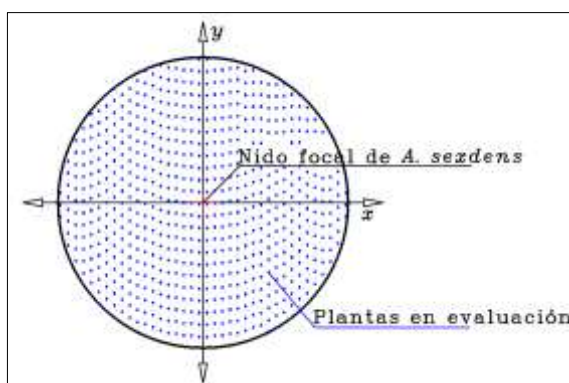


Figura 12. Esquema de una parcela circular de 1 ha de superficie, dividida en cuadrantes por ejes cartesianos y con un nido focal de *A. sexdens*.

A partir de los resultados de las evaluaciones, se observó que más del 90 % de las plantas evaluadas se clasificaron como plantas con defoliación total (resultante de la suma de las frecuencias de las clases C-4, C-5 y C-7) y en plantas sin defoliación (es decir, la clase C-0). Por lo tanto, se realizaron análisis de regresión lineal simple entre la distancia de las plantas al nido focal de *A. sexdens* y la frecuencia relativa de plantas con defoliación total y de plantas sin ataque. En el modelo resultante, se reemplazó la frecuencia de defoliación total por el valor del daño económico, para así obtener el valor de la distancia al nido (*D*) en la cual ocurre una probabilidad de defoliación igual al

daño económico. Tal distancia, fue transformada a valores de densidad equivalente de hormigueros con la Ecuación 3. De esta manera, por ejemplo, una planta que se encuentra a 20 m del nido focal, estaría afectada por una densidad equivalente de 7,95 nidos/ha, una que se encuentra a 40 m estaría afectada a una densidad de 2 nidos/ha, y una planta en la periferia de la parcela (56,4 m) estaría afectada por una densidad equivalente de 1 nido/ha. Entonces, como la densidad equivalente de hormigueros se obtuvo a partir de la distancia en la cual ocurre una probabilidad de defoliación igual al daño económico, se puede considerar que su valor es igual al nivel de daño económico de *A. sexdens* para plantaciones juveniles de *P. taeda* y *E. grandis*.

Ecuación 3. Cálculo de la densidad equivalente de hormigueros.

$\delta Eq = \frac{1}{\pi * D^2} * 10.000$	<p><u>Donde:</u></p> <p><math>\delta Eq</math>: Densidad equivalente de nidos (nidos/ha)</p> <p><math>D</math>: Distancia (m) a la que ocurre la defoliación umbral.</p>
--	--

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Efecto de la defoliación sobre la sobrevivencia y el crecimiento *P. taeda* y *E. grandis*

Para las dos especies forestales, los tratamientos tuvieron efectos significativos sobre la sobrevivencia de plantas ( $p < 0,0001$ ; log-rank test), siendo los de mayor intensidad de defoliación, aquellos que presentaron menor sobrevivencia. En el caso de *P. taeda*, se observaron sobrevivencias al final del experimento iguales al 100 % en los tratamientos T1, T2 y T4, del 95 % en los tratamientos T3 y T5, del 65 % en T6 y del 15 % en el T7 (Figura 13).

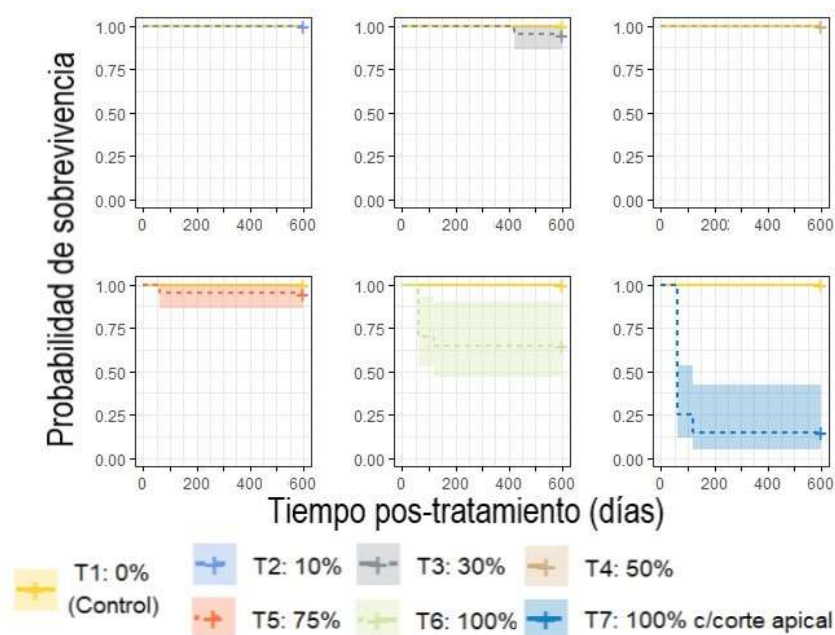


Figura 13. Curvas de sobrevivencia de plantas de *P. taeda* sometidas a distintos niveles de defoliación.

En *E. grandis*, en cambio, se encontraron mayores niveles de sobrevivencias en todos los tratamientos evaluados, siendo del 100 % en los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5, del 80 % en T6 y del 40 % en T7 (Figura 14). En las dos especies, se observa que la mayor parte de la mortalidad ocurrió en los primeros 60 a 120 días posteriores a la defoliación de las plantas (Figuras 13 y 14).

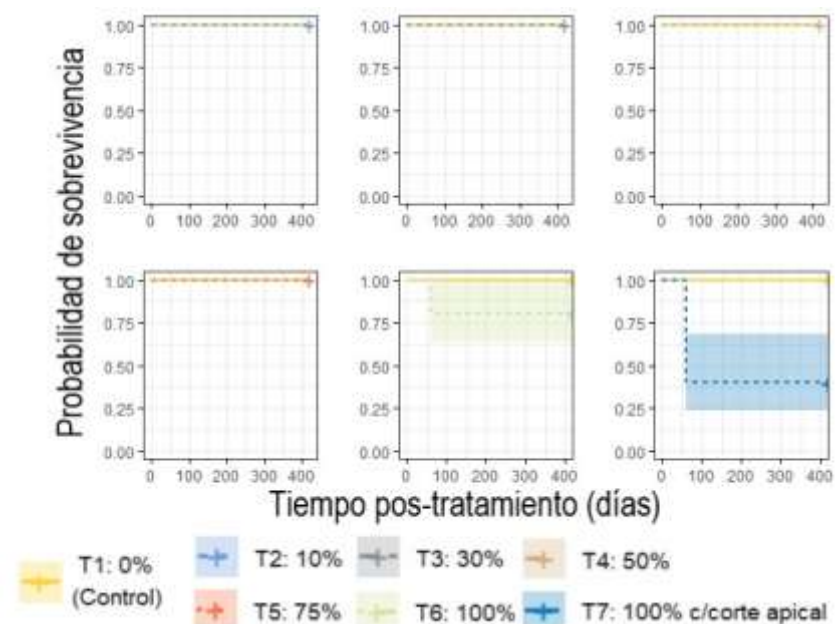


Figura 14. Curvas de sobrevivencia de plantas de *E. grandis* sometidas a distintos niveles de defoliación.

Según el modelo con mejor ajuste para el análisis del crecimiento en DAC, altura total e índice de volumen, en *P. taeda* se obtuvo que fueron significativos los efectos de los tratamientos (GL=6; F= 41,7;  $p<0,0001$ ), el tiempo (GL= 10; F= 992,2;  $p<0,0001$ ) y la interacción entre ambos tratamientos (GL= 60; F= 5,7;  $p<0,0001$ ). Los tratamientos de mayor intensidad de defoliación presentaron menor crecimiento a lo largo de las evaluaciones y las diferencias entre los tratamientos más extremos se amplifican con el paso del tiempo (Figura 15).

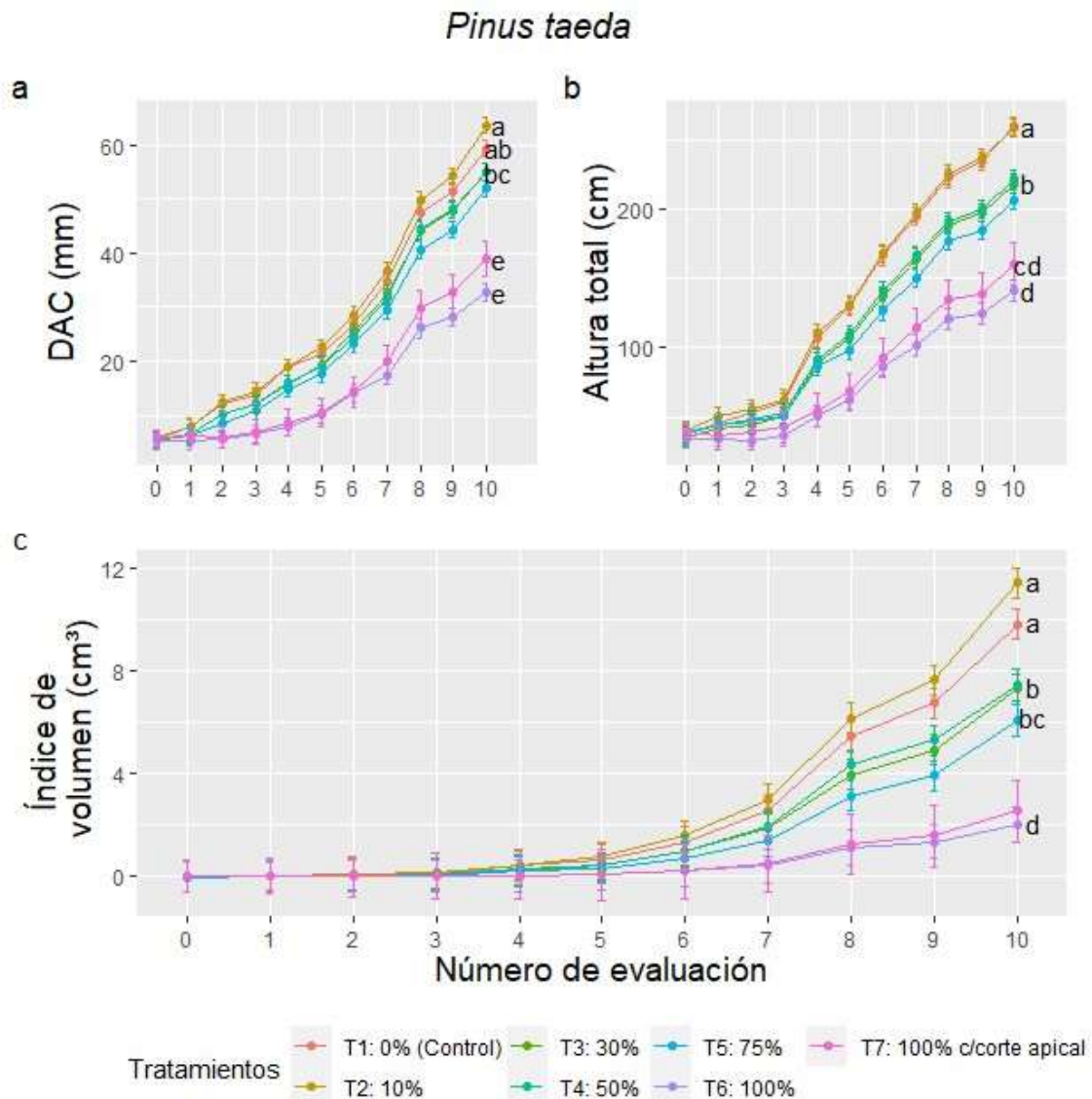


Figura 15. Perfiles del crecimiento en diámetro a la altura del cuello (a), altura total (b) e índice de volumen (c) de plantas juveniles de *P. taeda* sometidas a distintas intensidades de defoliación artificial. T1: 0 %, T2: 10 %, T3: 30 %, T4: 50 %, T5: 75 %, T6: 100 % y T7: 100 % con corte del meristema apical. Las barras corresponden al desvío estándar del modelo.

Al igual que en *P. taeda*, en el caso de *E. grandis*, los efectos de los tratamientos (GL=6; F= 37,1;  $p<0,0001$ ), el tiempo (GL=7; F= 1194,6;  $p<0,0001$ ), y la interacción entre ambos (GL=42; F= 4,4;  $p<0,0001$ ) fueron estadísticamente significativos, aunque las diferencias entre tratamientos sobre el crecimiento en DAC, altura total e índice de volumen, no fueron tan marcados. En esta especie forestal, los tratamientos de defoliación más extremos entre sí fueron los que presentaron diferencias estadísticas, las cuales aumentaron a lo largo del paso del tiempo (Figura 16).

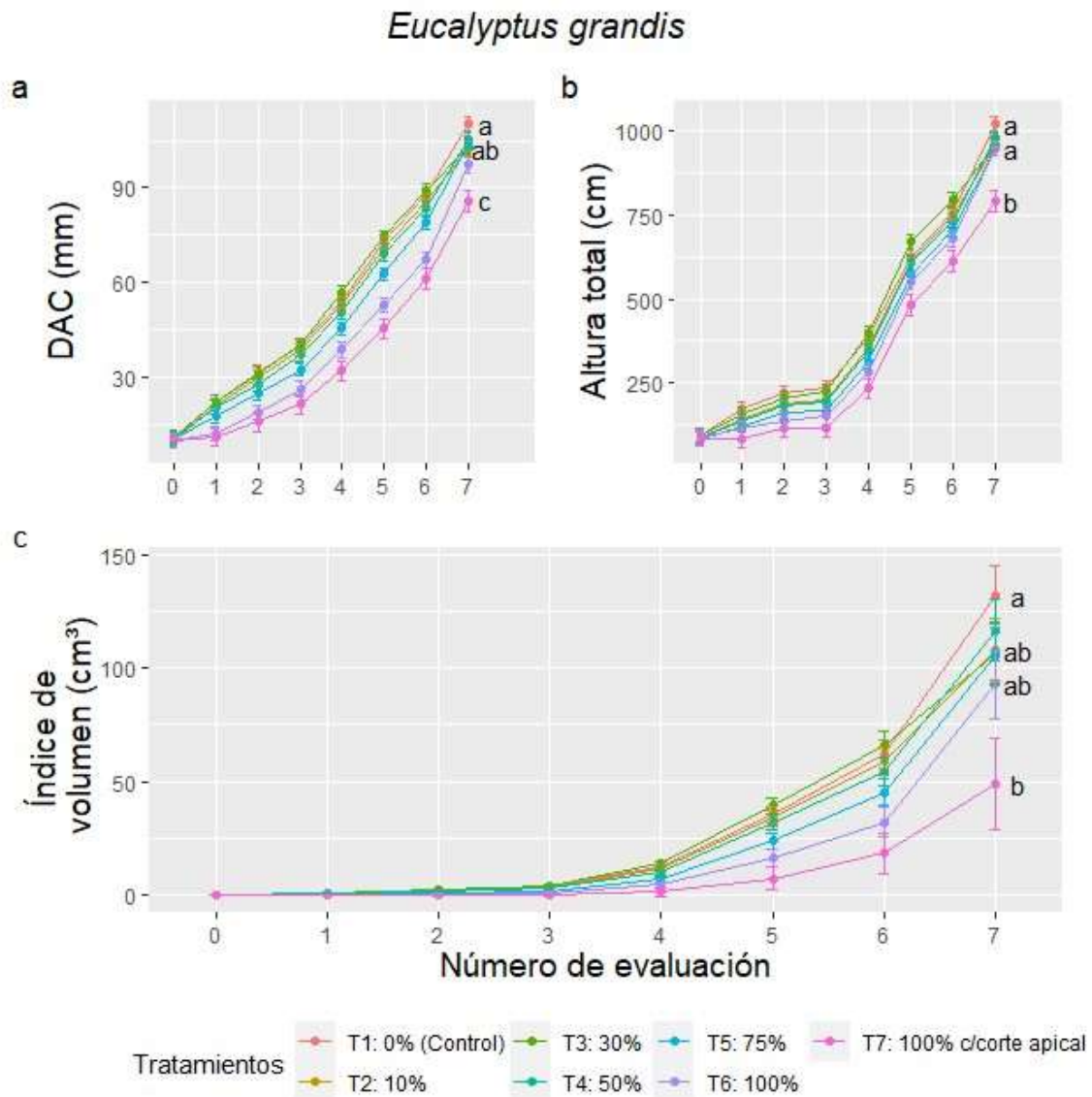


Figura 16. Perfiles del crecimiento en diámetro a la altura del cuello (a), altura total (b) e índice de volumen (c) de plantas juveniles de *E. grandis* sometidas a distintas intensidades de defoliación artificial. T1: 0 %, T2: 10 %, T3: 30 %, T4: 50 %, T5: 75 %, T6: 100 % y T7: 100 % con corte del meristema apical. Las barras corresponden al desvío estándar del modelo.

### 3.3.2 Validación de parte de los tratamientos de defoliación artificial con defoliación real de HCH

Los resultados obtenidos de los dos tratamientos de defoliación real (T8, defoliación del 30 % y T9, defoliación del 100 %) fueron comparados con sus equivalentes de defoliación simulada (T3 y T6, respectivamente). Las comparaciones de mortalidad en *P. taeda* entre T3 (5 %) y T8 (0 %) no fueron estadísticamente diferentes (método: log-rank;  $p=0,64$ ), tampoco entre T6 (35 %) y T9 (70 %) (método: log-rank;  $p=0,052$ ), a pesar que la defoliación real del 100 % presentó el doble de mortalidad de plantas que la simulada con tijera. En el caso de *E. grandis* los tratamientos T3 y T8 no presentaron mortalidad de plantas, en cambio T6 tuvo una mortalidad del 20 % y T9 del 40 % al final de las evaluaciones, resultando las comparaciones entre las dos curvas estadísticamente iguales (método: log-rank;  $p=0,34$ ).

En cuanto al crecimiento de las plantas en diámetro a la altura del cuello (DAC), altura total (HT) y el índice de volumen (IV), se muestran en la Tabla 5 las medias ajustadas para cada tratamiento, con los resultados de las comparaciones con la prueba de Tukey entre tratamientos dentro de cada especie, variable y número de evaluación. Se observa que, en todas las comparaciones, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de intensidad de defoliación equivalente (T3 vs. T8 y T6 vs. T9), es decir, que el efecto de la defoliación simulada sobre el crecimiento de estas dos especies forestales es comparable con la defoliación real producida por *A. sexdens*.

Tabla 4. Medias ajustadas por su respectivo modelo de las tres variables estudiadas sobre *P. taeda* y *E. grandis* en el periodo de evaluación. Letras en común indica que no existen diferencias significativas (Prueba de Tukey,  $\alpha=0,05$ , con valores de p ajustados por el método de Bonferroni), comparaciones realizadas para cada especie, variable y número de evaluación. T3: defoliación simulada del 30 %; T8: defoliación real del 30 %; T6: defoliación simulada del 100 %; T9: defoliación real del 100 %.

		Número de evaluación											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Pinus taeda	DAC (mm)	T3	5.2(a)	6.58(a)	10.1(a)	12.25(a)	15.93(a)	19.35(a)	25.43(a)	32.42(a)	44.2(a)	47.96(a)	55(a)
		T8	4.97(a)	6.35(a)	9.6(a)	11.78(a)	11.72(ab)	18.48(a)	25.15(a)	32.08(a)	42.55(a)	46.15(a)	51.67(a)
		T6	5.25(a)	5.2(a)	5.73(a)	6.56(a)	8(b)	10.29(b)	14.23(b)	17.59(b)	26.14(b)	28.19(b)	32.78(b)
		T9	4.4(a)	6.75(a)	6.77(a)	8.12(a)	11.21(ab)	13.23(ab)	17.91(ab)	23(b)	31.76(b)	35.19(b)	41.78(b)
	HT (cm)	T3	36(a)	41.4(a)	44.8(a)	50.5(a)	89.6(a)	106.9(a)	137(a)	164.9(a)	188.5(a)	197.8(a)	218.7(a)
		T8	34.5(a)	39.1(a)	42.8(a)	48.9(a)	87(a)	100.8(a)	135.2(a)	161.2(a)	178.2(ab)	192.3(a)	206.8(a)
		T6	33.9(a)	33.9(a)	33.5(a)	37(a)	50.7(b)	62.6(b)	86.7(b)	102.4(b)	121.4(c)	125.4(b)	141.8(b)
		T9	39(a)	39.8(a)	43.2(a)	53.4(a)	78.9(ab)	96(ab)	118(ab)	133.8(ab)	145.6(bc)	162.4(ab)	182.3(ab)
	IV (cm³)	T3	0.011(a)	0.02(a)	0.053(a)	0.085(a)	0.254(a)	0.446(a)	0.971(a)	1.892(a)	3.976(a)	4.93(a)	7.275(a)
		T8	0.009(a)	0.018(a)	0.046(a)	0.077(a)	0.131(a)	0.388(a)	0.941(a)	1.784(a)	3.421(a)	4.41(a)	5.964(a)
		T6	0.011(a)	0.01(a)	0.013(a)	0.019(a)	0.04(a)	0.089(a)	0.24(a)	0.421(a)	1.138(b)	1.361(b)	2.02(b)
		T9	0.008(a)	0.024(a)	0.025(a)	0.044(a)	0.143(a)	0.209(a)	0.434(a)	0.784(a)	1.581(b)	2.145(b)	3.437(b)
Eucalyptus grandis	DAC (mm)	T3	11(a)	22.2(a)	31.1(a)	40.2(a)	56.6(a)	74.4(a)	89.3(a)	103.2(a)			
		T8	10.1(a)	19.9(a)	29.1(ab)	38.6(a)	51.9(a)	74.4(a)	83.2(a)	98(ab)			
		T6	10.3(a)	12.5(a)	19(b)	26.4(b)	38.5(b)	52.3(b)	66.3(b)	96.4(ab)			
		T9	10(a)	12.6(a)	19.3(b)	26.9(b)	38.9(b)	54(b)	62.6(b)	91.2(b)			
	HT (cm)	T3	95.4(a)	158.5(a)	206.5(a) 192.2(ab)	226.1(a)	396.4(a)	669.5(a)	795(a)	961(a)			
		T8	90.1(a)	145(a)	)	219.6(a)	377.6(a)	659.5(ab)	736(ab)	921.5(a)			
		T6	90.8(a)	116.7(a)	141.1(b)	150.6(b)	284.3(b)	550.2(b)	674.8(b)	940.8(a)			
		T9	90.6(a)	112.4(a)	138.5(b)	150.3(b)	281.4(b)	548.1(b)	628.9(b)	903.9(a)			
	IV (cm³)	T3	0.141(a)	0.936(a)	2.339(a)	4.222(a)	13.957(a)	39.376(a)	66.411(a)	106.673(a)			
		T8	0.113(a)	0.692(ab)	1.95(a)	3.803(a)	11.183(a)	38.68(a)	53.514(a)	92.946(a)			
		T6	0.138(a)	0.187(b)	0.508(b)	1.029(b)	4.105(b)	14.629(b)	27.763(b)	83.032(a)			
		T9	0.119(a)	0.176(b)	0.537(b)	1.144(b)	4.44(b)	16.888(b)	24.792(b)	74.639(a)			

### 3.3.3 Determinación del nivel económico de defoliación

Por medio de la Ecuación 1 (Pág. 49) se realizó el cálculo del índice de pérdida de plantas y, multiplicando el resultado por el costo de plantación, se calculó la pérdida económica para seis niveles de defoliación (Tabla 6).

Tabla 5. Pérdida económica (PE) de cada nivel de defoliación de *P. taeda* y de *E. grandis*. IV: Índice de Volumen promedio en la última evaluación del experimento. IPP: Índice de Pérdida de Plantas (0 %-100 %). CP: Costo de plantación lograda según Colegio de Ingenieros Forestales de Misiones (2022) transformado a dólares estadounidenses. (\*): Valores negativos de IPP fueron consignados como 0 % y valores superiores a 100 % fueron consignados como 100 % de pérdida.

	Defoliación	Mortalidad	IV	IPP	CP	PE
		ad	(cm3)		(U\$D/ha)	(U\$D/ha)
<i>P. taeda</i>	0 %	0 %	9,80	0 %	\$ 1.299,58	\$ 0,00
	10 %	0 %	11,40	0 % (*)	\$ 1.299,58	\$ 0,00
	30 %	5 %	7,27	31 %	\$ 1.299,58	\$ 400,24
	50 %	0 %	7,44	24 %	\$ 1.299,58	\$ 313,13
	75 %	5 %	6,08	43 %	\$ 1.299,58	\$ 558,65
	100 %	35 %	2,02	100 % (*)	\$ 1.299,58	\$ 1.299,58
<i>E. grandis</i>	0 %	0 %	131,65	0 %	\$ 1.299,58	\$ 0,00
	10 %	0 %	107,9	18 %	\$ 1.299,58	\$ 234,45
	30 %	0 %	106,67	19 %	\$ 1.299,58	\$ 246,59
	50 %	0 %	116,48	11,5 %	\$ 1.299,58	\$ 149,83
	75 %	0 %	105,61	19,8 %	\$ 1.299,58	\$ 257,06
	100 %	20 %	92,87	49,5 %	\$ 1.299,58	\$ 642,79

Con los resultados de la Tabla 6 se realizaron análisis de la correlación entre la PE y la defoliación para ambas especies forestales. En el caso de *P. taeda* el modelo de correlación obtenido fue  $PE = -82,899 + 11,581 * Defoliación$  (Método= lm; F= 24,61; GL= 1 y 4; P= 0,0077), indicando un alto grado de correlación entre las variables ( $r^2$  ajustado= 0,8253. Figura 17 a). En *E. grandis* se encontró una regresión marginalmente significativa, el modelo ajustado fue  $PE = 57,61 + 4,472 * Defoliación$  (Método= lm; F= 7,556; GL= 1 y 4; P= 0,05144), el modelo indica una correlación media entre las variables ( $r^2$  ajustado= 0,5673. Figura 17 b).

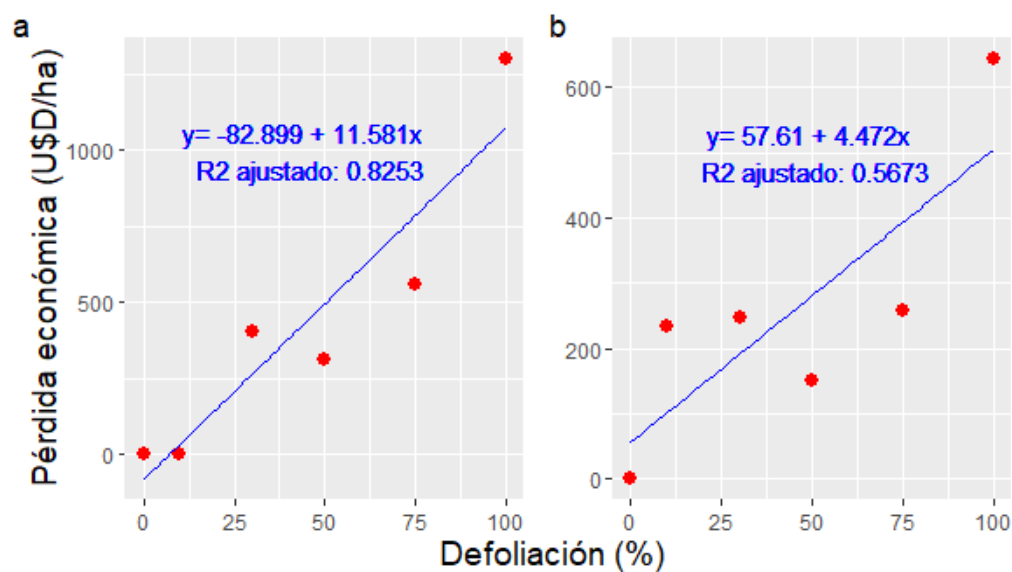


Figura 17. Correlación entre el porcentaje de defoliación de las plantas y la pérdida económica que se produce en *P. taeda* (a) y *E. grandis* (b).

Según un relevamiento del sector forestal argentino, realizado por Egolf et al. (2022), el costo por hectárea del control de HCH para Misiones y el norte de Corrientes se ubica entre 100 y 200 U\$D. Tomando estos valores, se consideraron tres escenarios posibles para el cálculo del daño económico, costo de control máximo, medio y mínimo respectivamente (Tabla 7).

Tabla 6. Nivel económico de defoliación de *P. taeda* y *E. grandis* para tres escenarios de costo de control de HCH. y: costo de control o pérdida económica. x: Nivel económico de defoliación o porcentaje de defoliación

	Escenario	Costo de control	Función de correlación	Nivel económico de defoliación
<i>P. taeda</i>	Costo mínimo	100 (U\$D/ha)		15,8 %
	Costo medio	150 (U\$D/ha)	$y = -82,899 + 11,581x$	20,1 %
	Costo máximo	200 (U\$D/ha)		24,4 %
<i>E. grandis</i>	Costo mínimo	100 (U\$D/ha)		9,5 %
	Costo medio	150 (U\$D/ha)	$y = 57,61 + 4,472x$	20,7 %
	Costo máximo	200 (U\$D/ha)		31,8 %

Como se observa en la Tabla 7, el nivel económico de defoliación en *E. grandis* presenta una mayor sensibilidad ante variaciones en el costo del control de HCH respecto a *P. taeda*, aunque para el costo medio, ambas especies presentan valores similares, ligeramente superiores al 20 %.

#### 3.3.4 Determinación del nivel de daño económico de *A. sexdens* en plantaciones recientes de *P. taeda* y *E. grandis*

En este experimento se obtuvo como resultado que las clases de daño más frecuentes fueron C-0 “sin daño” y C-4 “defoliación del 100 %” en las dos especies forestales. La frecuencia de plantas sin daño, en el caso de *P. taeda*, disminuyó progresivamente en las tres evaluaciones, notándose un mayor cambio entre las evaluaciones del día tres y la del día 15. La proporción de esta misma clase de daño, en el caso de *E. grandis*, disminuyó de la primera a la segunda evaluación y casi no presentó modificaciones hacia la tercera (Figura 18).

En tanto, la frecuencia de la clase C-4, en *P. taeda* fue en aumento en las sucesivas evaluaciones y en *E. grandis* aumentó en la segunda evaluación y disminuyó en la tercera, dando lugar a las clases de daño C-5 y C-7 (“muertas por HCH” y “atacadas al 100 % que rebrotaron”, respectivamente). Las clases de daño intermedias (C-1, C-2 y C-3) no presentaron frecuencias de magnitud considerable, siendo algo más frecuentes en la primera evaluación, momento en el que se observaron obreras forrajeando dentro de las parcelas. Esto indica, probablemente, que una vez que *A. sexdens* selecciona una plántula, continúa con la defoliación hasta que la misma ya no tenga hojas. Aunque, en *P. taeda*, se observó que ciertas plántulas quedaban con algunas acículas sin defoliar, y por eso la frecuencia relativa de la clase C-3, aunque baja, se mantuvo en todas las evaluaciones. Finalmente, las proporciones de la mortalidad por HCH (clase C-5) y del rebrote posterior a un ataque del 100 % (clase C-7) durante el periodo evaluado fueron mucho más evidentes en *E. grandis* que en *P. taeda*, debido a que los plantines de esta última especie fisiológicamente demoran más tiempo en mostrar signos de brotación o muerte (observ. pers., Figura 18).

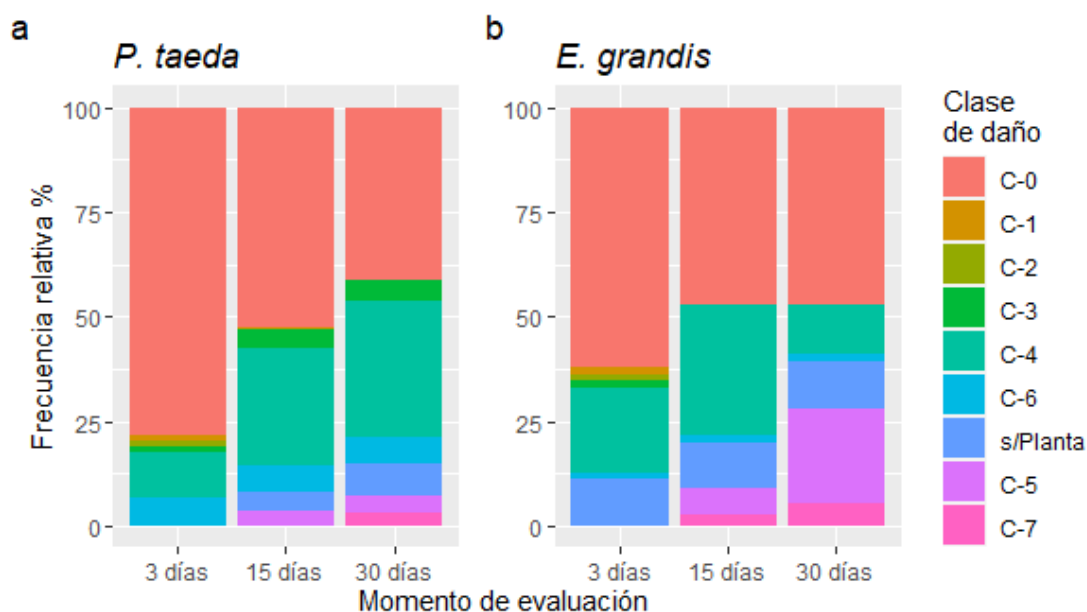


Figura 18. Frecuencias relativas de las distintas clases de daño producidas por *A. sexdens* en las tres evaluaciones realizadas sobre las parcelas circulares de *P. taeda* y *E. grandis*. C-0: sin daño, C-1: 1-50 % de defoliación, C-2: 51-75 % de defoliación, C-3: 76-99 % de defoliación, C-4: 100 % de defoliación con y sin corte de meristema apical. C-5: planta muerta por el ataque de *A. sexdens*. C-6: planta muerta por otro motivo, C-7: planta atacada al 100 % y que rebrotó.

Tanto en *P. taeda* como en *E. grandis*, se observó que más del 90 % de las plantas en los tres momentos de evaluación, pueden ser clasificadas en plantas sin ataque (es decir, la clase de daño C-0) y plantas que en algún momento sufrieron una defoliación total (resultante de la suma de las frecuencias de las clases C-4, C-5 y C-7). En las figuras 19 y 20 se presentan los resultados de las correlaciones entre la frecuencia de estas dos categorías de ataque y la distancia al nido focal.

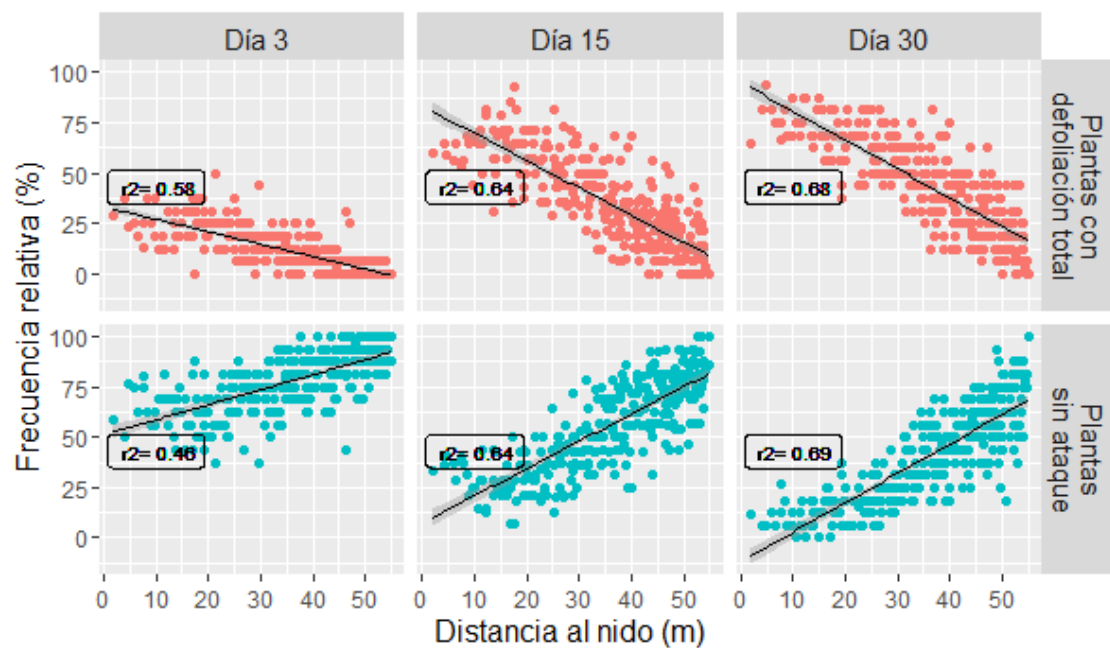


Figura 19. Correlación en las tres evaluaciones entre la frecuencia relativa de plántulas de *P. taeda* no atacadas y con defoliación total por *A. sexdens* en función a su distancia al hormiguero.

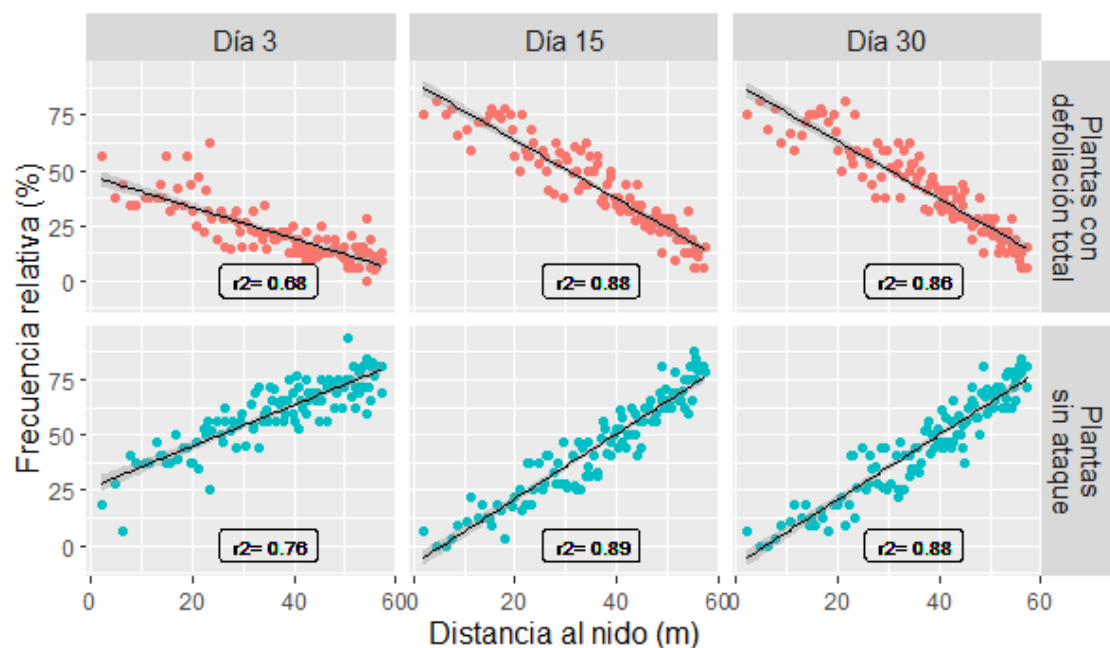


Figura 20. Correlación en las tres evaluaciones entre la frecuencia relativa de plántulas de *E. grandis* no atacadas y con defoliación total por *A. sexdens* en función a su distancia al hormiguero.

Para ambas especies y variables, frecuencia relativa de plantas con defoliación total de HCH y de plantas sin ataque de HCH, los modelos de regresión lineal simple tuvieron un buen grado de ajuste en cada una de las evaluaciones, con valores de  $r^2$  entre 0,46 y 0,69 en *P. taeda* y entre 0,68 y 0,89 en *E. grandis* (Método= lm;  $P < 0,0001$ ). En el caso de las plantas con defoliación total, se determinó que cuando aumenta la distancia de las

plantas al nido de *A. sexdens*, la probabilidad de ser defoliada disminuye linealmente, y viceversa, cuanto más cerca del nido se encuentre, la probabilidad de una defoliación total aumenta. El patrón inverso fue encontrado en las plantas sin ataque (Figuras 19 y 20).

Se encontró en todos los casos, además, diferencias significativas entre los modelos ajustados para las tres evaluaciones (*P. taeda*: ANOVA;  $p < 0,0001$ . *E. grandis*: ANOVA;  $p < 0,0001$ ). Al observar las figuras 19 y 20, se puede notar un marcado cambio de pendiente de las rectas de correlación entre la evaluación del día tres respecto de los días 15 y 30, mostrando que la probabilidad de ataque a menor distancia del nido aumenta considerablemente con el paso del tiempo. En *P. taeda*, las rectas ajustadas de la evaluación del día 15 y la del día 30 mantienen una pendiente similar, pero en el día 30 aumenta la frecuencia de plantas con defoliación total en todas las distancias (Figura 19). En cambio, en *E. grandis* las rectas en las dos últimas evaluaciones son muy similares tanto en pendiente como en ordenada al origen, indicando que en ese periodo *A. sexdens* no atacó a gran cantidad de plantas nuevas dentro del rango de distancias evaluado (Figura 20).

En la Tabla 8 se presentan las estimaciones del nivel de daño económico (NDE), calculados a partir del nivel económico de defoliación (Tabla 7) y las funciones de correlación lineal simple mostradas en las figuras 18 y 19 para la evaluación de los 30 días de las plantas con defoliación total.

Tabla 7. Nivel de daño económico (NDE) de *A. sexdens* para plantaciones juveniles de *P. taeda* y *E. grandis*, considerando tres escenarios de costo de control.

	Escenario	Nivel económico de defoliación	Función de correlación	Distancia al nido (m)	NDE (nidos/ha)
<i>P. taeda</i>	Costo mínimo	15,8 %		55,62	1,03
	Costo medio	20,1 %	$y = 95,34 - 1,43x$	52,61	1,14
	Costo máximo	24,4 %		49,61	1,3
<i>E. grandis</i>	Costo mínimo	9,5 %		61,43	0,84
	Costo medio	20,7 %	$y = 89,36 - 1,3x$	52,81	1,14
	Costo máximo	31,8 %		44,28	1,62

### 3.4 DISCUSIÓN

Nuestros resultados del experimento de defoliación simulada son similares a los encontrados en estudios realizados en otras regiones, principalmente de Brasil, en especies forestales de los mismos géneros. Los valores de crecimiento obtenidos en la última evaluación del experimento de defoliación simulada de *P. taeda*, el tratamiento más intenso respecto al testigo sin defoliar, tuvieron promedios menores en un 48 % del DAC, 46 % de la HT y 82 % el IV. Estos promedios son similares a los encontrados por Nিকেle (2008) a los seis meses posteriores a un evento de defoliación simulada, donde las diferencias entre el tratamiento de defoliación total con corte del meristema apical tuvieron una disminución del 39 % en DAC y un 42 % en altura respecto al testigo sin defoliar, este autor no estimó la diferencia en volumen, pero si utilizamos la fórmula de IV que usamos en este capítulo, obtenemos una disminución del 78 % en IV. En cambio, con respecto a la mortalidad, Nিকেle (2008) obtuvo porcentajes notablemente menores ya que, para niveles de defoliación equivalentes a los tratamientos T6 (100% de defoliación simulada) y T7 (y 100% de defoliación simulada con corte de meristema apical), fueron del 15 %, mientras que en nuestro estudio la mortalidad del T6 fue del 35 % y del T7 de 85 %. Por otro lado, Reis Filho et al. (2011), determinaron que luego de seis meses el tratamiento de defoliación simulada del 100 % con corte del meristema apical, provocó en *P. taeda* disminuciones muy similares en DAC (45 %) y en altura total (37 %), en tanto que la mortalidad de plantas se ubicó entre el 15 y 25 %. Cantarelli et al. (2008) describieron reducciones a los 24 meses similares en DAC (38 %) e índice de productividad (69 %), un estimador del volumen, mientras que la reducción en altura total fue del 17 %, menor a nuestro estudio y a los anteriormente descritos. No está claro cuál es la causa de esta diferencia en la mortalidad hallada entre nuestro estudio y los de Nিকেle (2008) y Reis Filho et al. (2011) para niveles de defoliación equivalentes. Una explicación podría ser las diferencias edafoclimáticas entre los sitios de estudio, por ejemplo, menor disponibilidad de agua en el suelo en el periodo en el que las plantas fueron sometidas a los tratamientos de defoliación. Sin embargo, no observamos eventos de sequía durante la realización de este ensayo.

En cuanto a *E. grandis*, determinamos, en el tratamiento de mayor intensidad de defoliación, que el DAC se redujo en un 29 %, la altura total en 24 %, el IV en un 63 % y la mortalidad fue del 60 %. Es decir que, comparado con *P. taeda*, esta especie no es afectada tan marcadamente por la defoliación, y lo mismo ocurre al comparar los

tratamientos de intensidades intermedias (T1 a T6). Reis Filho et al. (2011) también evaluaron la defoliación simulada con tijera sobre *E. grandis*, y obtuvieron a los 12 meses reducciones respecto del testigo sin defoliar, del 20 % en DAC y del 13 % en altura, siendo la mortalidad del 10 %, en el tratamiento de defoliación del 100 % sin corte del meristema apical (equivalente al tratamiento T6 de nuestro experimento). En un estudio de 96 meses de duración, Matrangolo et al. (2010) determinaron que, al final de las evaluaciones, plantaciones de *E. grandis* con un único evento de simulación de defoliación total, tuvieron reducciones del 18 % en diámetro a la altura del pecho (DAP), un 38 % en volumen individual y mortalidad del 7 % respecto al testigo sin defoliación. Reducciones más marcadas fueron encontradas por Freitas y Berti-Filho (1994) que obtuvieron reducciones de circunferencia a la altura del pecho (análogo al DAP) del 78,9 % y del 60,7 % en la altura para tratamientos de defoliación total realizada en el invierno.

Pocos trabajos han analizado la proporción de plantas atacadas por HCH en plantaciones. Cuando vemos los resultados de defoliación real producida por nidos de *A. sexdens*, encontramos que, luego de 30 días, un solo nido por hectárea de *A. sexdens* produce aproximadamente una frecuencia relativa de plantas totalmente defoliadas del 43 % en *P. taeda* y del 40 % en *E. grandis*. Núñez y Olmedo (2013), encontraron que en una plantación de *P. taeda* en la provincia de Corrientes, con una densidad de 4,8 nidos/ha de dos especies de *Acromyrmex*, la proporción de plantas atacadas severamente fue del 50 % a los seis meses. Estos resultados reforzarían la idea de productores de que *A. sexdens* genera daños mayores en las plantaciones en menos tiempo y a menores densidades de nido por hectárea de plantación.

Para ambas especies forestales encontramos que la clase de daño más frecuente, además de plantas sin daño, es la de defoliación total. Esto fue encontrado también por Núñez et al. (2020) y Nickele et al. (2012), y podría indicar que una vez que las HCH seleccionan una plántula, continúan con su defoliación hasta que la misma ya no tenga hojas.

Probablemente, esto ocurre debido a que en plantas tan juveniles no existan grandes diferencias de palatabilidad entre las hojas basales y apicales, entonces, las HCH optimizan la operación forrajeando lo máximo posible en cada planta. En las parcelas circulares de defoliación real se observó que, en *E. grandis*, casi todo el ataque a nuevas plantas ocurrió en los primeros 15 días posteriores a la plantación, mientras que en *P. taeda*, el ataque a nuevas plantas fue más progresivo durante el periodo de evaluación,

finalizando ambas especies forestales con proporciones similares de plantas atacadas al 100 % y de plantas sin ataque. Las correlaciones entre las probabilidades de ataque/no ataque de plantas y la distancia al hormiguero se ajustaron mejor de lo esperado, esto indica que es factible el uso de la metodología de parcelas circulares en plantaciones con alta densidad de plantas para el monitoreo del ataque de *A. sexdens*, a nuestro entender, este es el primer trabajo en el cual se emplea esta metodología. En otro estudio con *Acromyrmex lobicornis* Emery, una de las especies más voraces del género *Acromyrmex* (Pilati et al., 1997; Sabattini, 2017), se empleó otra metodología de evaluación, y se presenta un gráfico de progresión del daño en el que se observa una notable concentración de plantas atacadas en cercanías de los hormigueros, y da indicios de que también existe una alta correlación entre la probabilidad de ataque por HCH y la distancia al nido (Nuñez et al. 2020).

El nivel de daño económico (NDE) de *A. sexdens* en plantaciones nuevas de *P. taeda* se ubicó entre 1,03 y 1,3 nidos/ha y en *E. grandis* entre 0,84 y 1,62 nidos/ha según el escenario de costos de control de HCH (mínimo a máximo) relevados por Egolf et al. (2022). Muy pocos trabajos han estimado el NDE de HCH. Un caso fue Nuñez et al. (2020) en un estudio de defoliación real sobre *P. taeda* de 403 días de duración luego de la implantación en la provincia de Corrientes, donde determinaron valores de NDE de cero nidos por hectárea para *Ac. lobicornis* y de uno para *Ac. heyeri*, algo inferiores a los nuestros. En plantaciones de otras especies del género *Eucalyptus* de entre 24 a 84 meses en la sabana brasileña, Zanetti et al. (2003) encontraron que el NDE de HCH se ubicó entre 2,5 a 9 nidos/ha. También en Brasil, Souza et al. (2011) en eucaliptales de siete años de edad encontró NDE entre 13,4 a 39,2 metros cuadrados de nidos por hectárea, variando en función del índice de sitio. Si consideramos las plantaciones de eucaliptos en nuestra región de estudio (Capítulo 1), y tomamos en cuenta el tamaño medio de nidos de *A. sexdens* en ese rango de edad, los valores de NDE estimados por Zanetti et al. (2003) pueden ser expresados como 0,76 a 2,24 nidos/ha, valores bastante cercanos a los estimados en nuestro estudio.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio reflejan la importancia del manejo de las *A. sexdens* en etapas tempranas del ciclo forestal. Los valores de NDE alcanzados se asemejan bastante a los de estudios en otras regiones y con otras especies forestales y de HCH, e incluso a distintas edades del cultivo (Nuñez et al., 2020; Zanetti et al., 2003; Souza et al., 2011 y Jiménez et al., 2021). La metodología de las parcelas circulares para

evaluar la defoliación de *A. sexdens* resultó satisfactoria. Aunque se debe aclarar que los valores hallados de NDE en este estudio fueron determinados para frecuencias de intervención de entre 30 y 60 días, debido a que su cálculo parte de eventos de defoliación únicos y la evidencia indica que las HCH pueden defoliar varias veces una misma planta (Lewis y Norton, 1973; Hernández y Jaffé, 1995; Matrangolo et al., 2010). Si el silvicultor, durante el periodo de establecimiento de las plantaciones, considera realizar intervenciones separadas por más de 60 días, los NDE posiblemente sean menores a los determinados en nuestro estudio.

Consideramos que los valores del nivel económico de defoliación, mostrados en la Tabla 7, pueden ser una herramienta fundamental para la toma de decisiones por parte de los silvicultores con respecto al manejo de las HCH en general. Dado que esos porcentajes indican, para cada escenario de costo de control, la cantidad de defoliación que se puede tolerar en las plantaciones juveniles sin incurrir en pérdidas económicas. Así, operativamente, no sería determinante conocer la cantidad de hormigueros y especies que ocasionan ese nivel de defoliación. Entonces, en escenarios donde sea dificultoso encontrar los hormigueros (por topografía, cobertura del suelo, especies de HCH que no forman montículos) o por mera practicidad, los monitoreos podrían orientarse en determinar los niveles de defoliación de las plantaciones, y así decidir si es necesario realizar alguna intervención de control.

En situaciones donde el silvicultor se enfrenta a costos elevados para controlar las HCH, generalmente relacionados a problemas de accesibilidad o distancia que incrementan marcadamente los costos logísticos asociados, la opción más viable es la implantación de *E. grandis*. Bajo ese escenario, esta especie tolera niveles de ataque mayores que *P. taeda*. Por el contrario, en situaciones donde los costos de control son bajos, como en lotes con buena accesibilidad, la implantación de *P. taeda* sería la mejor alternativa.

Investigaciones previas encontraron que la susceptibilidad al ataque por HCH puede variar entre genotipos de una determinada especie forestal (Jiménez et al., 2022; Jiménez et al., 2021). Esta variación en la susceptibilidad al ataque podría modificar los NDE. Por ejemplo, genotipos susceptibles tendrían NDE menores y genotipos con algún grado de tolerancia tendrían NDE mayores. Las variedades de especies forestales utilizadas en nuestro estudio se encuentran entre las más plantadas en Misiones, es material proveniente de la empresa Arauco S.A., que cuenta con programas de

mejoramiento genético enfocados en características de crecimiento (Arauco, 2021). Las variedades forestales utilizadas poseen variabilidad genética intermedia, en los cuales podríamos encontrar buenos niveles de resistencia al ataque de plagas. Estudios han encontrado que plantaciones con mayor variabilidad genética se asocian a mayores niveles de resistencia a la herbivoría (Fernandez-Conradi et al., 2017; Tanksley y McCouch, 1997).

## CAPÍTULO 4: Impacto a largo plazo de *A. sexdens* sobre una plantación de *P. taeda*

Capítulo publicado: Scherf, A.N., Corley, J.C., Gioia, C.D., Eskiviski, E.R., Carazzo, C., Patzer, H.R. y Dimarco, R.D. 2022. Impact of a leaf-cutting ant (*Atta sexdens* L.) on a *Pinus taeda* plantation: A 6 year-long study. *Journal of Applied Entomology*, 146(9), pp.1178-1184.

### 4.1 INTRODUCCIÓN

Las plantaciones forestales en todo el mundo están amenazadas por una variedad de plagas y patógenos, que en su mayoría son especies exóticas invasoras (Aukema et al., 2011; Liebhold et al., 2017). Sin embargo, en algunos casos, los insectos nativos pueden causar impactos económicos importantes, al adoptar cultivos como alimento o refugio (Montoya-Lerma et al., 2012). A diferencia de los protocolos de manejo implementados en varias etapas del proceso de invasión de especies exóticas, el desafío aquí consiste en manejar las poblaciones de plagas nativas oportunistas de manera que reduzcan sus impactos en los cultivos, y que no los dañen de manera irreversible. Este es el caso de las HCH en América del Sur, que son nativas de esta región y que algunas especies causan daños significativos a una variedad de cultivos (Montoya-Lerma et al., 2012).

La silvicultura comercial es probablemente uno de los cultivos más afectados por las hormigas cortadoras de hojas (Della Lucia et al., 2014). Ellas pueden defoliar árboles enteros y, por lo tanto, causar una disminución en el crecimiento o incluso la muerte. Este tipo de daños se producen en todas las etapas del ciclo de plantación, pero los más severos son los observados durante el establecimiento de las plantaciones, que es cuando se produce la defoliación total e incluso daños en los meristemas basales o apicales (Capítulo 3; Cantarelli, 2005; Montoya-Lerma et al., 2012). Por ejemplo, nuestros resultados del Capítulo 3, muestran que un solo nido de *A. sexdens* puede causar defoliación total de alrededor del 40 % de las plantas de *P. taeda* establecidas en una hectárea de plantación. También, Nickle et al. (2020) encontraron que, en el sur de Brasil, un solo nido de *Acromyrmex crassipinus* era capaz de dañar 200 plántulas dentro de los 30 días posteriores a la plantación. Jiménez et al. (2021) demostraron que, después de un año, *Acromyrmex lundii* Guérin-Ménéville puede reducir el volumen de madera de las plantaciones de sauce (*Salix nigra* Marshal) hasta en un 90 %. En línea con estos hallazgos, otros trabajos en el NE de Argentina señalaron que *Ac. heyeri* y *Ac.*

*lobicornis* causaron pérdidas en plántulas de *P. taeda* del 20,8 % a los 65 días después de la plantación (Cantarelli et al., 2019).

Las plantaciones forestales en Argentina ocupan 1,2 millones de hectáreas, en las que predominan las coníferas que representan el 65 % de la superficie cubierta por todas las plantaciones de árboles del país. Las especies más plantadas son *P. taeda* y *P. elliottii* (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2015), y la región NE –provincias de Misiones y Corrientes– contiene el 64 % de todas las plantaciones forestales comerciales del país (Slutzky, 2016). En esta región también es donde se encuentra el mayor número de especies de HCH (antmaps.org, 2024; Farji-Brener y Ruggiero, 1994). En Argentina, existen 14 especies de HCH, de las cuales tres pertenecen al género *Atta* y las otras al género *Acromyrmex* y *Amoimyrmex* (Farji-Brener y Ruggiero, 1994; Cristiano et al., 2020). Una especie, *A. sexdens*, probablemente considerada la principal HCH plaga de cultivos en las Américas (Montoya-Lerma et al., 2012), tiene una distribución natural que se superpone con toda la provincia de Misiones y el norte de Corrientes (Farji-Brener y Ruggiero, 1994). Naturalmente, entonces, el impacto de esta especie en la productividad forestal se percibe como significativo (Della Lucia et al., 2014).

La mayoría de los estudios publicados hasta la fecha han evaluado el daño causado por las HCH solo durante las etapas iniciales del ciclo de *P. taeda* (Buratto et al., 2012; Cantarelli, 2005; Cantarelli et al., 2008; Cantarelli et al., 2019; Nিকেle, 2008; Nuñez et al., 2020; Reis Filho et al., 2011). Una excepción es Nিকেle et al. (2020) quienes han evaluado el impacto a largo plazo de HCH en el crecimiento de rodales de *P. taeda*, pero con un solo evento de defoliación artificial para simular el ataque de HCH. A pesar de la importancia para el desarrollo de un enfoque de manejo integrado de plagas eficiente y sostenible, hay escasez de información sobre los impactos reales de la herbivoría de *Atta* sp. más allá de las etapas iniciales de las plantaciones de *Pinus*. El objetivo de este capítulo fue determinar los efectos a largo plazo de la especie HCH más común, *A. sexdens*, en plantaciones de *P. taeda* en el NE de Argentina. Esta información es fundamental para los silvicultores y administradores de tierras para determinar los umbrales de daño económico de esta plaga en sus plantaciones comerciales.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Área de estudio

Este trabajo se realizó en una plantación de *P. taeda* a cargo de la empresa forestal Arauco Argentina SA (25°52'41.68"S; 54°21'3.37"O) en el municipio de Puerto Iguazú, ubicado en la Provincia de Misiones, Argentina. El clima es subtropical húmedo con una precipitación media anual de alrededor de 1800 mm en régimen isohídrico y una temperatura media anual de 21 °C con la ocurrencia ocasional de heladas invernales (Köppen, 1948). El suelo de la zona es del tipo rojo, profundo, perteneciente al gran grupo de Kandiodultes, arcilloso y bien drenado (Fernández et al., 2015). Las plantaciones allí son de *P. taeda* exclusivamente y se destinan principalmente a la producción de pulpa de celulosa, con un ciclo plantación-cosecha de 13 años.

### 4.2.2 Diseño experimental

El experimento se estableció en 2014 en un área reforestada de *P. taeda* de aproximadamente 90 ha, propiedad de la empresa Arauco Argentina SA. Para iniciar una nueva plantación de *P. taeda*, se realizó el control total de malezas y de HCH. El control de las HCH fue realizado con aplicaciones de cebos granulados de sulfluramida (0,3 %) en forma dirigida a dosis de 10 g por metro cuadrado de montículo nido y sistemática a razón de 1,5 kg/ha. El control de malezas fue total y químico, y el método utilizado fue el mismo que en el resto de las plantaciones de la empresa, que consiste en una aplicación de herbicida pre-siembra, con dos aplicaciones de mantenimiento en el año cero de la plantación, tres en el año uno y uno en los años dos y tres. Después de estos controles y preparación del suelo, se plantaron manualmente plantines de *P. taeda* de alrededor de 35 cm de altura y 10 mm de diámetro basal, material genético proveniente del huerto semillero de la empresa. La distancia entre plantas en el campo fue de 2,6 m y entre hileras de 3,1 m. Además, aproximadamente cada 50 m, cuatro hileras de siembra quedaron sin sembrar debido a que en estos lugares se depositó la biomasa residual de la cosecha anterior, resultando una densidad efectiva de 933 árboles/ha.

En el tercer año después de la plantación, se establecieron una gran cantidad de nidos de HCH. Entonces, se decidió iniciar este experimento. Para ello, se delimitaron las 90 ha en dos áreas, una de 56 ha donde se realizó un control total de los nidos de HCH, y la otra de 34 ha donde en adelante no se realizó ningún tipo de control de HCH. En el interior de cada una de estas dos áreas se delimitó una subárea de 11 ha, en las cuales se

realizó el experimento. Estas dos subáreas de 11 ha fueron denominadas como tratamiento con control total de HCH y sin control de HCH, respectivamente. Dentro de cada subárea, se establecieron 11 parcelas permanentes circulares de muestreo con una superficie de 250 m<sup>2</sup> (Figura 21). El número total de parcelas circulares fue de 22 (11 en cada tratamiento), resultando en una intensidad de muestreo de 2,5 % y 465 árboles evaluados. La distancia lineal de forrajeo de los nidos adultos de *Atta* spp. es de 50 m en promedio y puede llegar hasta los 200 m (Kost et al., 2005); por lo tanto, la subárea correspondiente al tratamiento de control total de HCH se ubicó a más de 200 m del área del tratamiento sin control de HCH para evitar el forrajeo en ese tratamiento (Figura 21).

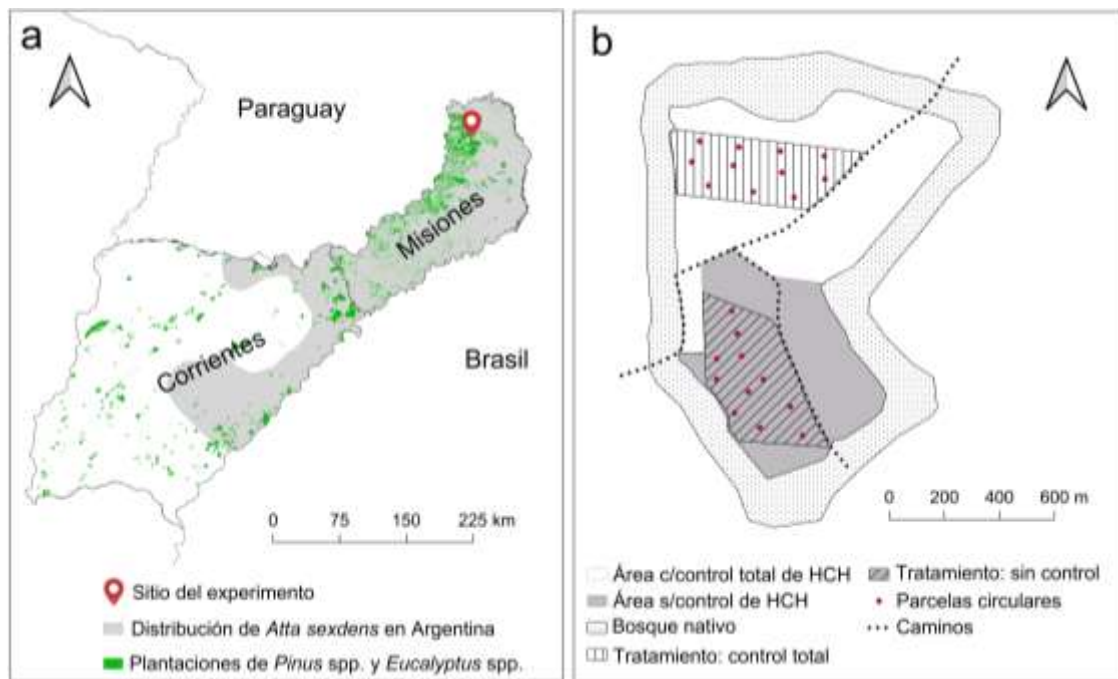


Figura 21. (a) Mapa de la principal zona de Argentina donde se ubican las plantaciones de pino (Instituto Geográfico Nacional de la República Argentina, 2022; Ministerio del Agro y la Producción, 2022), y distribución de *A. sexdens* en dicha zona (basado en Farji- Brener y Ruggiero, 1994). (b) Croquis de la plantación de *P. taeda* con los dos tratamientos y la ubicación de las parcelas circulares de muestreo.

Al comienzo del experimento, se realizó un censo de todos los nidos de HCH en la zona de tratamiento sin control de HCH, donde se identificó taxonómicamente cada nido y se midió su superficie de montículo. Hubo un total de 81 nidos pertenecientes en su totalidad a *A. sexdens*, con un área de montículo promedio de  $29,93 \pm 26,95$  m<sup>2</sup> (Media  $\pm$  DE). Por hectárea, esto equivale a 7,36 nidos/ha y 237 m<sup>2</sup>/ha. En las múltiples visitas al sitio durante los años de estudio, los nidos HCH permanecieron activos y no se observó el establecimiento de nuevos nidos. En el tratamiento de control total de HCH, no había nidos al inicio del experimento. Para asegurar que continúe libre de nidos, se

realizaron inspecciones anuales y aplicaciones sistemáticas preventivas de cebos tóxicos, con especial cuidado en los bordes para que las hormigas del tratamiento de control (sin HCH) no llegaran a esos cebos tóxicos.

Las variables medidas a los árboles fueron el diámetro a la altura del pecho (DAP) de todos los fustes en las parcelas permanentes (465 árboles estudiados), la altura total de 10 árboles en cada parcela (220 árboles estudiados) y la mortalidad de árboles por parcela permanente. Las mediciones de campo se realizaron anualmente desde el tercer al sexto año después de la plantación (es decir, hasta la mitad del ciclo de cosecha).

#### *4.2.3 Análisis estadístico*

Las dos variables, DAP y altura total de los árboles, se evaluaron como medidas repetidas en el tiempo con un modelo lineal general y mixto en R versión 4.0.2, usando una versión para estudiantes de InfoStat-2020 como interfase, donde los tratamientos y el año de la evaluación fueron asignados como efectos fijos y el árbol como un efecto aleatorio. Este mismo software se utilizó para la creación de figuras. Las comparaciones entre las medias de los tratamientos se realizaron con la prueba LSD de Fisher. En cada caso se corroboraron los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas. Los datos de mortalidad fueron transformados por el método probit y comparados entre ambos tratamientos por una prueba de t en el último año de medición, donde cada parcela circular se consideró como una réplica.

El volumen de madera comercial de cada tratamiento se estimó con ecuaciones de volumen de *P. taeda* ajustadas para el área de estudio, utilizando el software simulador forestal PLAFORNEA versión 2017.

### **4.3 RESULTADOS**

Al inicio de las evaluaciones en 2017, los árboles en ambos tratamientos (sin control de HCH y control total de HCH) partieron con una situación de alturas y diámetros similares. Después de 2017, las comparaciones de crecimiento entre tratamientos mostraron diferencias significativas tanto en los promedios de DAP como en la altura total en todos los años (Tabla 9). Los pinos en el tratamiento sin control de HCH presentaron los promedios más bajos de DAP y altura total (Figuras 22 y 23).

Tabla 8. Análisis de la varianza de las pruebas de hipótesis secuenciales para el diámetro a la altura del pecho (DAP) y altura total de árboles de *P. taeda* ( $\alpha = 0,05$ )

	DAP			Altura total		
	Grados de libertad	F-valor	P-valor	Grados de libertad	F-valor	P-valor
Tratamiento	1	9,22	0,0025	1	49,35	<0,0001
Año	3	4228,62	<0,0001	3	926,82	<0,0001
Interacción: Tratamiento-Año	3	9,25	<0,0001	3	44,16	<0,0001

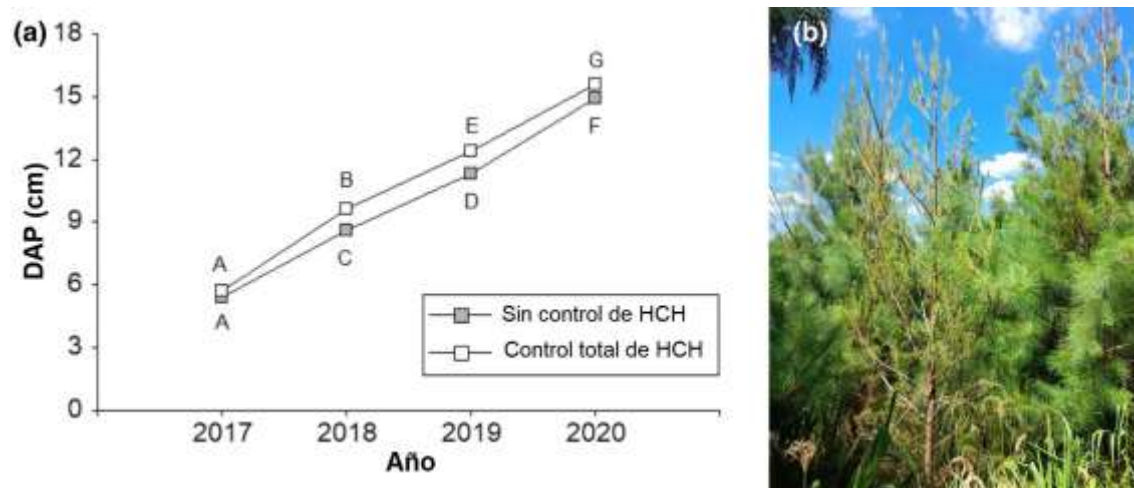


Figura 22. (a) Perfiles de crecimiento del diámetro promedio a la altura del pecho (DAP) de *P. taeda*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ). (b) Imagen de una parcela permanente de muestreo que muestra árboles de *P. taeda* defoliados por *A. sexdens*.

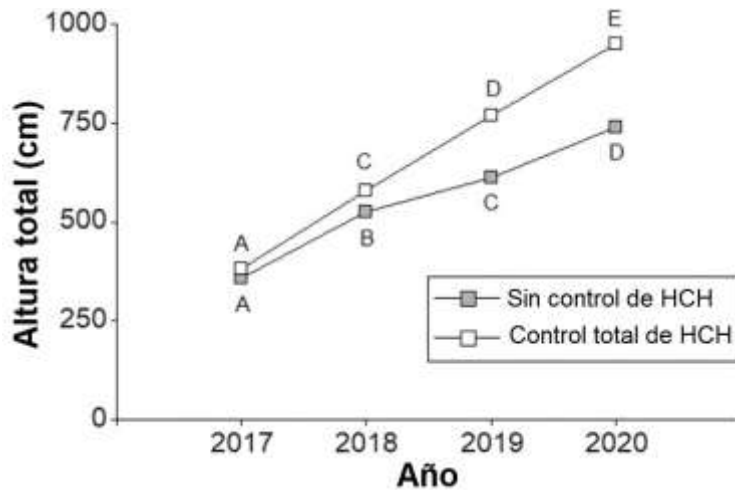


Figura 23. Perfiles de crecimiento en altura total promedio de *P. taeda*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

En el último año de evaluación, se observó que los árboles en el tratamiento sin control de HCH tenían un DAP promedio 4,4 % más bajo y una altura total promedio 19 % más baja que los árboles del tratamiento de control total de HCH (Figuras 22 y 23). La altura total de los pinos fue más afectada que el DAP cuando las HCH estuvieron presentes (Figura 23).

La mortalidad de los pinos en la mitad del ciclo de cosecha (seis años después de la siembra) fue significativamente mayor en el tratamiento sin control de HCH ( $31,2 \% \pm 10,8$ ; media  $\pm$  DE) que en el tratamiento de control total de HCH ( $8,5 \% \pm 4,7$ ; media  $\pm$  DE) ( $t = -4,64$ ; GL = 20; P-valor = 0,0002).

La diferencia anual en las estimaciones del volumen de madera comercial entre el tratamiento de control total de HCH y el de sin control de HCH aumentó, y en el sexto año, esta diferencia alcanzó los  $17,7 \text{ m}^3/\text{ha}$  (Tabla 10).

Tabla 9. Volumen de madera comercial de *P. taeda* en los tratamientos control total de HCH y sin control de HCH en cada año. Calculado con el software PLAFORNEA.

Edad de la plantación	Año de la evaluación	Volumen de madera comercial con corteza (m <sup>3</sup> /ha)		
		Control total de HCH	Sin control de HCH	Diferencia
3	2017	4	3,6	0,4
4	2018	19	13,2	5,8
5	2019	42,9	30,7	12,2
6	2020	83,5	65,8	17,7

#### 4.4 DISCUSIÓN

Se encontró que la altura total, el DAP y el volumen de madera de *P. taeda* fueron significativamente menores en las parcelas con la presencia de *A. sexdens*, con reducciones en el orden del 19 %, 4,4 % y 21 %, respectivamente, después de seis años de la plantación. También se encontró que la altura total de los árboles se vio más afectada que su DAP. Estudios previos, donde se evaluó un solo evento de defoliación al inicio del ciclo de plantación, encontraron patrones opuestos (Cantarelli et al., 2008; Nিকেle et al., 2020; Reis Filho et al., 2011). Además, Nিকেle et al. (2020) encontraron que seis años después de un solo evento de defoliación artificial al 100 %, las plantas de *P. taeda* no mostraron diferencias significativas en su altura total al compararlas con los testigos sin defoliación. Por lo tanto, nuestros resultados, con la defoliación natural de las hormigas cortadoras de hojas, muestran que la herbivoría continua puede afectar fuertemente el crecimiento de los pinos, incluida la altura de los árboles.

La reducción del DAP encontrada en este estudio (4,4 %), es similar a la observada en el diámetro de la base del tallo por Reis Filho et al. (2011) en árboles de *P. taeda* a los 12 meses después de un solo evento de defoliación artificial del 50 %; y son significativamente inferiores a la reducción del DAP del 21 % medida por Nিকেle et al. (2020) para un solo evento de defoliación artificial del 100 %. Se atribuyen estas diferencias de diámetro al hecho de que cuando las HCH atacan a los árboles, no atacan a todos los árboles adultos por igual en un área. Sino que, las HCH tienden a defoliar algunos árboles repetidamente, mientras que otros sufren ataques menos intensos o incluso ninguno (Barnola et al., 1994; Santana y Couto, 1990; observ. pers.). Por esta razón, los árboles no atacados o menos atacados podrían haber tenido reducciones en la

competencia por la luz y los nutrientes, y en consecuencia aumentar en mayor medida su diámetro; compensando parcialmente la pérdida del diámetro medio del rodal.

La pérdida de volumen de madera comercial encontrada para el tratamiento sin control de HCH en la última evaluación (año 6) fue del 21 %, valor en el rango de los obtenidos por trabajos realizados en otras plantaciones de *Pinus* (pero ver Hernández y Jaffé, 1995). Cantarelli et al. (2008) estimaron una reducción en el índice de productividad de ~12.1 % en plántulas de *P. taeda* (que también estima el volumen de madera), 36 meses después del ataque de *Acromyrmex* spp., pero desconocían el número de nidos de HCH en su sitio de muestreo. Nickele et al. (2020) también encontraron que hubo una reducción del 39 % en el volumen de madera de árboles de *P. taeda* después de seis años, pero nuevamente, esto se debió a un evento de defoliación 100 % artificial y no a la defoliación real realizada por HCH en los pinos.

Se obtuvo que la mortalidad de los pinos al año 6 alcanzó el 31,2 % en presencia de *A. sexdens*, en comparación con solo el 8,5 % cuando se controlaron las HCH. Aunque podrían existir otros factores involucrados en la mortalidad de los pinos, principalmente relacionados al estrés al momento de la implantación (plantas defectuosas y falta de agua) y a daños por maquinaria en las operaciones de control de malezas; consideramos que el ataque por HCH fue el factor principal. En un estudio con *Acromyrmex crassispinus* Forel y *Ac. subterraneus*, Nickele et al. (2020) observaron que la mortalidad de plántulas de *P. taeda* fue de 6,5 % y 5 % para cada especie de hormiga, respectivamente, después de 30 días de plantadas. Reis Filho et al. (2011) encontraron que plantines de *P. taeda* defoliados artificialmente presentaron mortalidades del 25 % al cabo de un año. Estos resultados anteriores, en los que solo hubo un evento de defoliación artificial, podrían no estar representando exactamente cómo las HCH atacan a los árboles y podrían estar subestimando el crecimiento y la mortalidad de los árboles. Las HCH muestran preferencia y suelen cosechar el mismo árbol varias veces y a lo largo de varios años (Cantarelli et al., 2008; Pérez et al., 2011; observ. pers.). En un solo evento de defoliación total, el crecimiento de los pinos puede retrasarse, pero después de dos eventos consecutivos de defoliación, generalmente ocurre la muerte (Lewis y Norton, 1973). Esto podría explicar por qué los resultados en mortalidad de nuestro trabajo son más altos que los de estudios previos.

Aunque este experimento se llevó a cabo en un solo sitio, es el primer estudio que midió el impacto real a largo plazo del ataque de HCH en una plantación de *P. taeda*. Aquí, se cuantificó el impacto de una sola especie de HCH en la mortalidad de los árboles y las pérdidas de crecimiento en altura total, DAP y volumen de madera comercial, durante la mitad del ciclo de cosecha de una plantación de *P. taeda*. Los silvicultores y administradores forestales pueden usar esta información para ajustar sus programas de manejo integrado contra esta importante plaga, en los casos en que la densidad de nidos de *A. sexdens* sea similar o mayor que la presentada en este estudio. Por ejemplo, en nuestro sistema de estudio, el control de los nidos de HCH después del tercer año de plantación podría haber aumentado la cosecha forestal en más del 20 %, pero el costo del manejo del control de HCH también debe considerarse para la toma de decisiones.

Bajo los criterios de MIP, los administradores forestales podrían usar estos resultados como una herramienta para ayudar a decidir si realmente se justifica un control adicional de HCH en las plantaciones comerciales, más allá de los estándares que se realizan anualmente hasta el tercer año de plantación. Tomando como referencia los costos de control presentados en el capítulo anterior, que varían entre 100 a 200 USD por hectárea (Egolf et. al., 2022), y los precios de referencia para la madera comercial de pinos con destino de pulpa celulósica publicado por el Instituto Forestal Provincial de 25 USD por tonelada (Instituto Forestal Provincial, 2024), la operación de control de HCH ya estaría económicamente justificada a partir del año 4, donde la pérdida de 5,8 m<sup>3</sup>/ha (Tabla 10) representa una pérdida de 145 USD/ha (25\*5,8).

## CAPÍTULO 5: Selección de un aislamiento local de hongo entomopatógeno del género *Beauveria* para el control de *A. sexdens*

### 5.1 INTRODUCCIÓN

A pesar de que las HCH son insectos nativos de la región neotropical, algunas especies alcanzan densidades superiores en paisajes modificados antropogénicamente, como áreas de tala del bosque y la implantación de cultivos agrícolas y forestales (Capítulo 1; Vieira-Neto et al., 2016; Wirth et al., 2007). Las HCH se benefician directamente de la mayor disponibilidad de áreas abiertas para sitios de anidación y de la escasez de enemigos naturales (Farji-Brener, 2001). En el suelo para cultivos, encuentran un lugar apropiado para construir nidos y hay una gran disponibilidad de especies vegetales adecuadas para el cultivo de su hongo mutualista (Vieira-Neto et al., 2016; Wirth et al., 2007). De esta manera, se han convertido en una de las principales plagas de los cultivos en donde nidifican, entre ellos, las plantaciones forestales (Montoya-Lerma et al., 2012).

El control actual de las HCH sigue siendo químico. Se usan principalmente cebos insecticidas granulados y polvos secos que se insuflan al interior de los hormigueros con la ayuda de un espolvoreador por corriente de aire conocido como bomba insufladora. Uno de los desafíos que se presenta actualmente en el manejo de las HCH es el desarrollo de estrategias de control que sean más amigables con el medio ambiente y la salud de las personas, al mismo tiempo que sean efectivas y operativamente viables. Una estrategia que podría reunir estos criterios es el control biológico.

El control biológico es una técnica utilizada en la agricultura, especialmente en el marco del MIP y en la agricultura orgánica, que consiste en el uso de organismos vivos para controlar y reducir las poblaciones de plagas por debajo de los niveles de daño económico. Estos organismos vivos pueden ser patógenos, parasitoides, depredadores o competidores de los organismos plaga (Fischbein, 2012). Una ventaja de esta forma de control es la reducción del uso de pesticidas químicos, que pueden ser dañinos para el medio ambiente y la salud humana.

El control biológico utilizando hongos entomopatógenos es una técnica que se basa en el uso de algunos grupos de hongos que infectan y matan a insectos. En los agroecosistemas, los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de regular de manera natural las poblaciones de insectos. Esta regulación depende de la susceptibilidad del

hospedero y de la interacción específica entre el patógeno y el hospedero. En este último caso, el insecto hospedero puede ejercer una presión de selección que favorece a unos pocos genotipos del patógeno, lo que implica una especialización de estos microorganismos con respecto a su hospedero. Por lo tanto, un mismo aislamiento de hongo puede ser muy activo sobre una especie o biotipo de plaga y no serlo sobre otra (Maurer et al., 1997; Wraight et al., 2010).

En condiciones normales, los hongos entomopatógenos afectan a las poblaciones de insectos en niveles enzoóticos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones como la presencia de factores estresantes o debilitantes en los insectos, condiciones ambientales apropiadas, o una alta presión de propágulos por parte del microorganismo parásito, pueden ocurrir epizootias que generan niveles elevados de mortalidad y disminuyen drásticamente las poblaciones (Vazquez Moreno y Elósegui Claro, 2011). El proceso de infección de los hongos entomopatógenos comienza con la adhesión de las esporas o conidios a la cutícula del insecto. Con la humedad adecuada, estas germinan segregando enzimas que degradan la cutícula hasta penetrar al hemocoele, donde el hongo crece y se multiplica. Durante este proceso, el hongo secreta toxinas y enzimas que debilitan y matan al hospedero. Finalmente, luego de unos días comienza la fase de reproducción y dispersión, se produce la extrusión de micelio a través de las articulaciones y espiráculos donde el hongo vuelve a producir las esporas o conidios que se dispersan en el ambiente y pueden infectar a otros insectos (Mora et al., 2018).

Entre los grupos de hongos entomopatógenos que tienen mayor potencial en el control de las HCH se encuentra el género *Beauveria* (Ascomycota: Hipocreales), de distribución cosmopolita y que presenta al menos 17 especies reconocidas que parasitan a los insectos (Imoulán et al., 2017; Chen et al., 2018). Entre las cualidades de *Beauveria* que lo vuelven importante para el control biológico se encuentra su amplia gama de hospederos, que permite la selección de biotipos altamente activos ante un artrópodo plaga específico, alta producción de conidios y su posibilidad de producción industrial (Imoulán et al., 2017; Chen et al., 2018; Amobonye et al., 2020).

Con técnicas culturales y morfológicas *Beauveria* es fácilmente reconocible hasta el nivel de género, pero la clasificación de sus especies no es posible de realizar con estas técnicas porque existen especies crípticas (Khonsanit et al., 2020; Imoulán et al., 2017). Incluso puede ser dificultoso identificarlas con técnicas típicas de taxonomía molecular

de los hongos como las basadas en la región ITS del ARNr. Por esto, estudios recientes indican que la identificación de las especies de *Beauveria* se debería realizar con un enfoque multigénico sobre cuatro genes nucleares (*RPB1*, *RPB2*, *TEF-1α* y el bloque intergénico) (Imoulan et al., 2017).

Los estudios acerca del empleo de hongos entomopatógenos para combatir a las HCH han ganado gran impulso en los últimos años. Se ha demostrado que estas hormigas son susceptibles a estos microorganismos (Loureiro y Monteiro, 2005; Folgarait et al., 2020; Stefanelli et al., 2020), especialmente en condiciones controladas de laboratorio. No obstante, los ensayos a campo han planteado diversos obstáculos para esta estrategia de control biológico. En particular, resulta difícil vulnerar la inmunidad social de las colonias bien establecidas de HCH, que han desarrollado a lo largo de su evolución mecanismos eficaces de higiene individual y colectiva, que incluso involucran asociaciones con bacterias que segregan sustancias micocidas (Santos et al., 2004).

Aunque las pruebas a campo han demostrado variaciones de la efectividad en el uso de hongos entomopatógenos para el control de HCH (Folgarait y Goffré, 2021; Fernandez-Daza et al., 2019; Lopez y Orduz, 2003), esta estrategia biológica sigue siendo una de las más prometedoras. Una de sus ventajas es que se pueden formular bajo presentaciones similares a las de los insecticidas comerciales químicos usados para las HCH, como cebos o polvos, lo que facilitaría su implementación por parte de los productores forestales que ya tienen experiencia en el uso de estos formulados. Sin embargo, aún se necesita encontrar un aislamiento que sea efectivo en las condiciones del campo y ante las especies de HCH específicas que se quieren controlar. Además, se requiere la tecnología adecuada para lograr una presión de inóculos suficiente para vencer la inmunidad social de las colonias de HCH.

El objetivo de este capítulo consistió en obtener y seleccionar, en condiciones de laboratorio, un aislamiento local de hongos entomopatógenos del género *Beauveria* con potencial para el control de nidos de campo de *Atta sexdens*.

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### *Colecta de material en campo*

Se realizó una prospección de hongos entomopatógenos en hormigueros de *A. sexdens* ubicados en diversos cultivos perennes –forestales, yerba mate y cítricos– de Misiones.

Se consideraron siempre cultivos debido a que creemos que los aislamientos obtenidos en esos lugares ya estarían adaptados a las condiciones ambientales donde pretenden ser utilizadas finalmente.

La prospección consistió en excavar superficialmente con pala los montículos de cada nido, con el objetivo de promover la salida de abundante cantidad de hormigas, pero sin alcanzar la profundidad de las cámaras del hongo simbiote. De allí, se colectó una muestra por cada hormiguero que consistió en un recipiente esterilizado de plástico de 25x40x15 cm con tapa aire-permeable conteniendo en su interior 2-3 cm de tierra húmeda del montículo del hormiguero, y alrededor de 200 a 400 hormigas obreras mayores. Se tomaron muestras de un total de 50 hormigueros distribuidos en cultivos forestales, yerba mate y cítricos del área de estudio. Estos recipientes fueron rotulados y transportados al laboratorio, donde se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente y humedad relativa alta (~80 %) durante 10 a 15 días, manteniendo inspecciones diarias a partir del quinto día. En las inspecciones, se verificó la aparición de hormigas con la esporulación característica del hongo de género *Beauveria*, en caso positivo, se extrajo con pinza entomológica el cadáver esporulado y se lo depositó en una placa de Petri estéril rotulada para mantener la trazabilidad del correspondiente nido.

#### *Aislamientos puros*

Los cadáveres esporulados alojados en placas de Petri, se transportaron a cámara de flujo laminar con el fin de obtener cultivos puros del hongo. Para ello, con una aguja histológica estéril se colectó una pequeña cantidad del hongo de las zonas esporuladas y limpias de los cadáveres de hormigas. Esta pequeña cantidad de hongo se transfirió al medio de cultivo APD con antibiótico (se usó ampicilina o estreptomicina, para disminuir la probabilidad de contaminación por bacterias) contenido en placas de Petri, y se inocularon hasta tres placas por nido. Las placas sembradas fueron transferidas a incubadora a temperatura controlada de  $25 \pm 1$  °C por 8 a 10 días, aguardando el crecimiento de colonias de hongos con las características del género *Beauveria*. Pasado ese tiempo, además del crecimiento de colonias con las características de *Beauveria*, normalmente, también había otros hongos considerados contaminantes. Entonces, en esos casos, se procedió a re-aislar colectando con aguja histológica estéril una pequeña cantidad del hongo de interés de una zona lo más alejada del contaminante, y nuevamente se transfirió a una placa con medio de cultivo APD, pero ya sin antibiótico. Estas placas también fueron incubadas a  $25 \pm 1$  °C por 8 a 10 días, aguardando el

crecimiento de las colonias. Este procedimiento se realizó hasta obtener placas solo con colonias de hongos con las características morfológicas de *Beauveria*.

#### *Cultivos monospóricos*

En cámara de flujo laminar, se tomó una placa por aislamiento puro, con la colonia de *Beauveria* plenamente esporulada. El contenido de cada placa fue recolectado por raspaje con ansa ojal y depositado en el interior de un tubo de ensayos cargado con 10 ml de agua destilada estéril. Se tapó el tubo con film y se agitó con vórtex por unos minutos hasta observar una suspensión homogénea. De este primer tubo, se tomó una alícuota de 1 ml para, por el método de las diluciones seriadas, obtener una suspensión de  $1 \times 10^{-4}$  veces diluida. De esta suspensión, se tomó con micropipeta un volumen de 130  $\mu$ l que fue dispensado en placas de Petri con medio APD y esparcido con espátula de Drigalsky en forma homogénea por toda la superficie del medio de cultivo. Se prepararon cuatro placas por aislamiento, las cuales se pusieron en incubadora a 25 °C durante 48 o 72 h dependiendo del crecimiento, hasta observar a trasluz la aparición incipiente de colonias originadas por un solo conidio.

Las colonias monospóricas fueron levantadas con aguja estéril y repicadas en una nueva placa con medio APD, un solo repique por placa, totalizando cuatro placas por aislamiento. Estas nuevas placas, fueron llevadas a incubadora a 25 °C hasta confirmar su prendimiento y posterior esporulación. Se seleccionó, finalmente, una sola placa con cultivo monospórico por aislamiento, las demás fueron descartadas. Así, a partir de este paso, se trabajó con aislamientos de origen monospórico.

De cada aislamiento monospórico, se realizaron preparados para la observación morfológica, con microscopio estereoscópico y tinción con azul de algodón, de micelio y estructuras reproductivas. Mediante la clave morfológica tomada de Alves (1998) se comprobó que todos los aislamientos monospóricos correspondían al género *Beauveria*.

#### *Resguardo del material*

A partir de placas con cultivos monospóricos esporulados, se procedió al resguardo de los aislamientos bajo tres métodos diferentes de conservación, estos fueron gel de sílice, agua destilada y glicerol. En el caso de la conservación con gel de sílice, se procedió a realizar una suspensión de conidios en leche descremada estéril, se homogenizó con vórtex y se tomaron alrededor de 100  $\mu$ l con micropipeta, con lo cual se embebieron las

partículas de gel de sílice estériles y secas, contenidas en  $\frac{3}{4}$  partes de un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Finalmente, los tubos fueron rotulados y mantenidos en heladera a  $\sim 5^{\circ}\text{C}$ .

Para los métodos de resguardo en agua y en glicerol, se utilizó igual procedimiento. En ambos casos, se realizaron cortes de las placas con cultivos monospóricos esporulados en forma de cubos de alrededor 5 mm de lado sobre el medio de cultivo. Estos cubos se transfirieron al interior de tubos Eppendorf, ocupando alrededor de  $\frac{3}{4}$  partes de su volumen interior. Se completó el volumen de los tubos con agua destilada estéril o con glicerol 10 % estéril. Finalmente, los tubos con aislamientos conservados en agua destilada, se mantuvieron en heladera a  $\sim 5^{\circ}\text{C}$ . Mientras que los conservados en glicerol, se mantuvieron en freezer ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).

#### *Producción y almacenado de conidios*

Partiendo de colonias esporuladas provenientes de cultivos monospóricos, se inocularon placas de Petri con medio de esporulación. La inoculación consistió en retirar con ansa ojal una abundante alícuota de conidios de una colonia esporulada y depositarla en una placa nueva con medio de esporulación, la misma fue esparcida por toda la superficie mediante una espátula de Drigalsky estéril. Se cultivaron 20 placas por aislamiento y por vez, las cuales fueron incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 8 a 10 días, hasta observar esporulación plena.

Cuando las colonias esporularon, se procedió a la colecta y secado de los conidios. Por aislamiento, se rasparon las placas con espátula estéril, el material resultante se depositó en bases de placas de Petri vacías y estériles, cubriendo el fondo con una delgada capa de conidios. Terminado el raspado, las bases de placas con conidios se introdujeron en frascos de vidrio estériles con una capa de 5 cm de gel de sílice en su interior, los cuales se taparon herméticamente durante 3 – 4 días para secar los conidios. Una vez secos, el material fue tamizado con un tamiz de malla 35, y el polvo de conidios resultante se depositó en frascos estériles de vidrio de 40 ml previamente tarados. Se rotuló, pesó y almacenó en freezer hasta el momento de su utilización.

#### *Obtención de las hormigas para los bioensayos*

Fueron colectadas obreras mayores de un hormiguero activo de *A. sexdens* del Campo Anexo Laharrague del I.N.T.A. E.E.A. Montecarlo. Las mismas, junto con algo de tierra húmeda de los montículos, fueron depositadas en el interior de recipientes plásticos de 25x40x15 cm con tapa aire-permeable, previamente lavados y desinfectados con alcohol

70 % y secados al sol directo. Los recipientes con hormigas fueron transportados al laboratorio, donde se dejaron reposar a 24 °C durante alrededor de 15 h.

Al momento de iniciar la aplicación de los tratamientos, los recipientes fueron colocados por unos minutos en heladera hasta que el grupo de hormigas pasó al estado de quiescencia. De esta manera, se pudo seleccionar de manera ordenada a las obreras mayores que no tuvieran signos de lesiones o desmembramientos, las cuales fueron transferidas a vasos plásticos con tapa en grupos de 10 individuos, aguardando la aplicación del respectivo tratamiento.

#### *Bioensayos de selección de aislamientos*

Los 11 aislamientos fueron sometidos a bioensayos para evaluar su actividad sobre la mortalidad de la HCH *A. sexdens*. Un primer bioensayo fue realizado con el total de los aislamientos para seleccionar los tres más activos ante esta especie de HCH. Este bioensayo consistió en 12 tratamientos: el control (C) y cada uno de los 11 aislamientos de *Beauveria* logrados (H5, H6, H7, H8, H9, H11, H12, H14, H15, H16 y H17, cuya trazabilidad se detalla en la Tabla 13). Cada tratamiento consistió en la aplicación tópica con rociador de 1 ml de una suspensión de conidios en una solución estéril de Tween 80 (0,01 %) de  $1 \times 10^8$  conidios/ml a grupos de 10 obreras mayores de *A. sexdens*. Estas obreras fueron posteriormente alojadas en placas de Petri desinfectadas y fondo revestido con papel de filtro humedecido con agua destilada, con el fin de brindar un ambiente húmedo (HR ~ 80 %) para el correcto desarrollo tanto de las hormigas como del hongo. Para el tratamiento control (C), las hormigas fueron rociadas solamente con 1 ml de la solución estéril de Tween 80 (0,01 %).

Cada tratamiento contó con cinco placas de Petri con 10 obreras cada una (50 hormigas por tratamiento), totalizando 60 placas y 600 hormigas en evaluación en todo el experimento. Las placas fueron mantenidas en un estante en el interior del laboratorio, con incidencia de luz natural indirecta, temperatura de 25 °C, y humedad relativa de alrededor del 80 %.

En simultáneo con el inicio del bioensayo, para asegurar que los inóculos utilizados en el bioensayo se encuentren activos, se realizó una prueba de viabilidad de los conidios de cada aislamiento. En cámara de flujo laminar, por cada aislamiento, se tomaron alícuotas de conidios a partir de los frascos almacenados en freezer. Con los conidios se preparó una suspensión en solución estéril de Tween 80 (0,01 %), ajustando la

concentración a  $1 \times 10^6$  conidios/ml mediante recuento con un hemocitómetro tipo cámara de Neubauer. Se dispensaron con micropipeta 200  $\mu$ l de esa suspensión en placas de conteo con 3 ml de medio APD, cubriendo completamente la superficie del mismo. Se cultivaron tres placas por aislamiento y se incubaron a 25 °C durante 20 h. Transcurrido este tiempo, con microscopio estereoscópico, se realizó el conteo de 200 conidios, diferenciando en germinados (tubo germinativo igual o mayor a dos veces el diámetro del conidio) y no germinados (sin tubo germinativo o de longitud menor a dos veces el diámetro del conidio). Por el cociente entre el número de conidios germinados y el número total de conidios, se calculó el porcentaje de viabilidad por placa. El promedio de la viabilidad de las tres placas, se consideró como la viabilidad de conidios del aislamiento. Para que el bioensayo se considere válido, se estableció que todos los aislamientos tenían que tener viabilidad de conidios mayor al 90 %.

Las evaluaciones del bioensayo se realizaron cada 24 h y durante 10 días, registrando el número de hormigas muertas por placa. Las hormigas muertas se retiraron con pinza entomológica desinfectada y se desinfectaron superficialmente por inmersión durante 30 segundos en alcohol 70 % y doble enjuagado en agua destilada estéril. Posteriormente, los cadáveres se depositaron en el interior de placas de Petri desinfectadas, con el fondo revestido con papel absorbente seco, rotuladas con la fecha de muerte, tratamiento y repetición correspondiente, y dispuestas en una cámara húmeda realizada con un contenedor plástico de 45x25x15 cm, de cierre hermético y con el fondo cubierto con una plancha de goma espuma humedecida con agua. El recipiente fue envuelto para generar oscuridad en su interior, la cual, combinada con la humedad relativa alta, favorece la esporulación característica de *Beauveria* sobre las articulaciones de las hormigas. A partir del quinto día posterior al primer registro de muerte en el bioensayo, y hasta 10 días después de la última muerte, diariamente se inspeccionó la cámara húmeda para confirmar si la muerte de las hormigas fue provocada por la acción del hongo entomopatógeno, observando y registrando en planillas el número de cadáveres con la presencia de esporulación en sus articulaciones.

Idéntica metodología a la descrita anteriormente se utilizó en el segundo bioensayo, con la diferencia que en esta oportunidad se redujo el número de aislamientos en evaluación. Los tratamientos en este segundo bioensayo fueron un control más los tres aislamientos que mostraron mayor actividad ante *A. sexdens*, con el fin de determinar si los resultados son consistentes y de seleccionar el aislamiento más activo de esos tres,

visando su posterior producción y pruebas de control en hormigueros del campo (ver Capítulo 6). Cada tratamiento contó con cinco placas de Petri con 10 obreras cada una (50 hormigas por tratamiento), totalizando 20 placas y 200 hormigas en evaluación en todo el experimento.

#### *Análisis estadístico*

Se utilizó el estimador de Kaplan-Meier para calcular las funciones de supervivencia de cada tratamiento, considerándose cada hormiga como unidad experimental ( $n=50$ ). Se realizaron comparaciones entre pares de curvas con la prueba de Log-rank (o Mantel Haenszel), cuyos p-valores fueron ajustados con el método de Bonferroni para mantener un nivel de significación global del 5 %. Además, a partir de estas funciones, se determinó el tiempo letal medio con sus respectivos intervalos de confianza inferior y superior de la mediana, que corresponde al tiempo necesario para obtener una probabilidad de muerte del 50 %.

Por otro lado, se contabilizó el número de hormigas muertas por placa, total y confirmadas, entre tratamientos al décimo día de las evaluaciones. Se consideró, en este caso, cada placa de Petri con un grupo de 10 obreras mayores ( $n=5$ ) como la unidad experimental. Los conteos de hormigas muertas, total y confirmadas, fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y se utilizó el método de Bonferroni para la corrección de los p-valores. En los casos donde los datos no cumplían con el supuesto estadístico de homocedasticidad, se realizó la transformación  $\text{sen}^{-1}\left(\frac{x}{10}\right)$ .

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R (versión 4.2.2), para la supervivencia y el tiempo letal medio se emplearon los paquetes *Survival* y *SurvMiner*, mientras que la mortalidad fue analizada con el paquete *Agricolae*.

### 5.3 RESULTADOS

#### *Colecta de material*

De las 50 muestras recolectadas, 18 presentaron hormigas con la esporulación característica de hongos del género *Beauveria*.

#### *Aislamientos puros, cultivos monospóricos y producción de conidios*

A partir de las hormigas esporuladas, obtenidas de 18 hormigueros diferentes, se lograron obtener 11 aislamientos puros (Tabla 11). En los otros siete nidos evaluados no

fue posible obtener aislamientos exitosos debido a contaminaciones muy agresivas con hongos no deseados.

Tabla 11. Aislamientos de hongos entomopatógenos obtenidos a partir de nidos de *A. sexdens* en distintos cultivos de la provincia de Misiones, Argentina.

	Aislamiento	Género	Hospeder o	Cultivo	Localidad
1	H5	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>E. grandis</i>	Wanda, Misiones
2	H6	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>P. taeda</i>	Colonia Delicia, Misiones
3	H7	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>Paulownia tomentosa</i> (Thunb.) Steud. + <i>Ilex</i> <i>paraguariensis</i> A.St.-Hil.	Caragatatay, Misiones
4	H8	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>E. grandis</i>	Lujan, Misiones
5	H9	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	Cítricos	Montecarlo, Misiones
6	H11	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	Cítricos	Montecarlo, Misiones
7	H12	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>Pa. tomentosa</i> + <i>I.</i> <i>paraguariensis</i>	Caragatatay, Misiones
8	H14	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>P. taeda</i>	Lujan, Misiones
9	H15	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>E. grandis</i>	Colonia Delicia, Misiones
10	H16	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>P. taeda</i>	Wanda, Misiones.
11	H17	<i>Beauveria</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>P. taeda</i>	Montecarlo, Misiones

### *Bioensayos de selección de aislamientos*

#### Primer bioensayo

Los resultados del primer bioensayo mostraron que todos los aislamientos evaluados presentaron funciones de supervivencia menores en comparación con el control sin aplicación, y se observaron diferencias significativas entre los aislamientos. El grupo que presentó los mayores descensos en las curvas de supervivencia estuvo conformado por los aislamientos H17, H8, H7, H6, H5 y H9 (Figura 24).

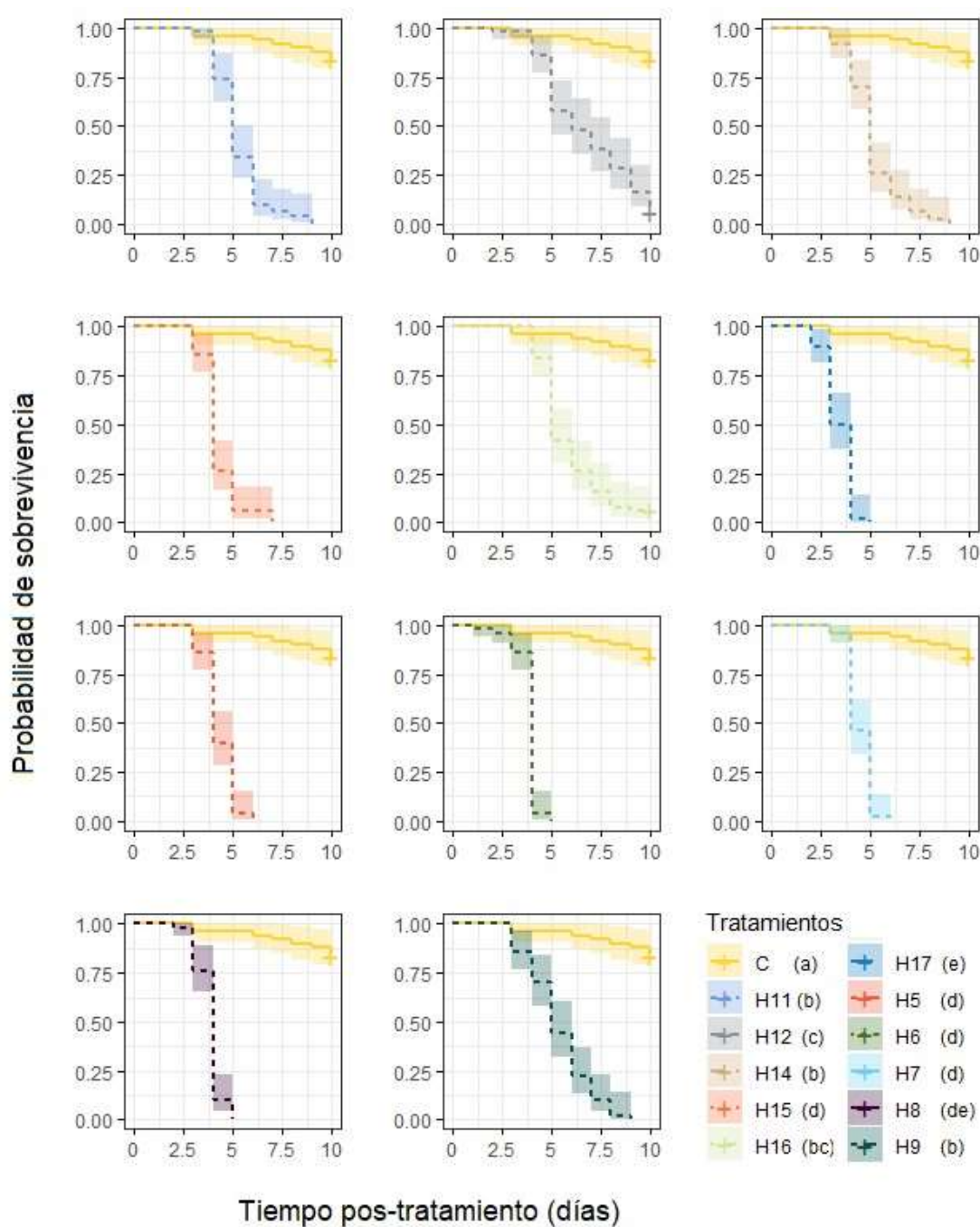


Figura 24. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de obreras mayores de *A. sexdens* tratadas con 11 aislamientos locales de *Beauveria* spp. más un control (C). Las letras distintas, ubicadas entre paréntesis al costado de la leyenda de los tratamientos, indican diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Log-rank entre pares de curvas, con ajuste por el método de Bonferroni para mantener el  $\alpha$  igual a 0,05.

Los tiempos letales medios correspondientes a los diferentes aislamientos se resumen en la Tabla 12. En dicha tabla se puede apreciar que el aislamiento H17 presentó el menor tiempo letal medio, con un valor de 3,5 días, seguido por el grupo conformado por los aislamientos H5, H6, H7, H8 y H15, con 4 días. Los demás aislamientos evaluados presentaron valores de tiempo letal medio mayores.

Tabla 12. Tiempo letal medio de cada tratamiento en el bioensayo 1. No se pudo determinar el tiempo letal medio del tratamiento control (C) ya que presentó una supervivencia mayor al 50 % en el período evaluado de 10 días.

Tratamiento	Tiempo letal medio (días)	IC 95 % inferior	IC 95 % superior
H17	3.5	3	4
H5	4	4	5
H6	4	4	4
H7	4	4	5
H8	4	4	4
H15	4	4	4
H9	5	5	6
H11	5	5	6
H14	5	5	5
H16	5	5	6
H12	6	5	8
C	n/d (>10)		

Los 11 aislamientos evaluados se mostraron activos para el control en laboratorio de obreras de *A. sexdens*, ya que todos produjeron la esporulación característica de *Beauveria* spp. En cuanto a la mortalidad total, se observaron valores significativamente mayores en todos los aislamientos en comparación con el control ( $\chi^2$ : 44,6; GL: 11; p-valor: <0,0001). Asimismo, al considerar la mortalidad confirmada, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos del bioensayo ( $\chi^2$ : 32,3; GL: 11; p-valor: 0,0007); sin embargo, los aislamientos H12, H16 y H5 no presentaron diferencias significativas en comparación con el control. Tomando en cuenta este criterio, se identificaron cuatro aislamientos con mejor desempeño, ya que produjeron una mortalidad confirmada del 100 %, estos fueron: H17, H6, H7 y H8 (Tabla 13).

Tabla13. Mortalidad confirmada y total de obreras mayores de *A. sexdens* enfrentadas a 11 aislamientos locales de *Beauveria* spp. Los tratamientos con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Tratamiento	n	Mortalidad confirmada (%)		Mortalidad total (%)	
		Promedio $\pm$ D.E.	Mediana	Promedio $\pm$ D.E.	Mediana
C	5	0 $\pm$ 0	0 a	14 $\pm$ 5,5	10 a
H11	5	96 $\pm$ 5	100 b	100 $\pm$ 0	100 b
H12	5	90 $\pm$ 12	90 ab	94 $\pm$ 9	100 b
H14	5	96 $\pm$ 9	100 b	100 $\pm$ 0	100 b
H15	5	98 $\pm$ 4	100 b	100 $\pm$ 0	100 b
H16	5	90 $\pm$ 12	90 ab	94 $\pm$ 13	100 b
H17	5	100 $\pm$ 0	100 b	100 $\pm$ 0	100 b
H5	5	90 $\pm$ 10	90 ab	100 $\pm$ 0	100 b
H6	5	100 $\pm$ 0	100 b	100 $\pm$ 0	100 b
H7	5	100 $\pm$ 0	100 b	100 $\pm$ 0	100 b

H8	5	100 ± 0	100 b	100 ± 0	100 b
H9	5	98 ± 4	100 b	100 ± 0	100 b

Se observó un alto nivel de viabilidad en todos los aislamientos evaluados, puesto que los porcentajes de germinación superaron el 90 % en todos los casos. No obstante, se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos ( $\chi^2$ : 19,56; GL: 10; p-valor: 0,0336), y se determinó que H6 y H14 fueron los aislamientos con menor viabilidad, significativamente menores a los demás, como se puede apreciar en la Figura 25.

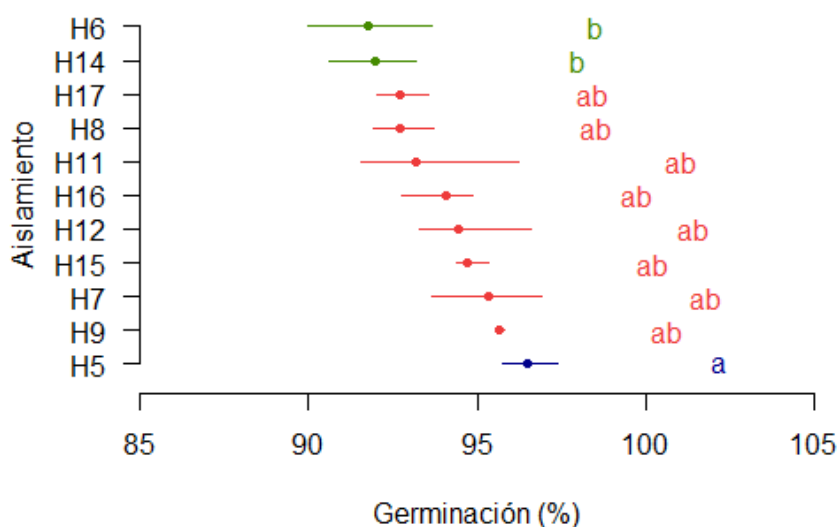


Figura 25. Porcentaje de germinación de conidios de los 11 aislamientos evaluados en el bioensayo 1. Barras con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Hommel para comparaciones múltiples.

Tras realizar el primer bioensayo de selección de aislamientos, se obtuvieron resultados concluyentes que permitieron determinar que los aislamientos con mejor desempeño fueron H17, H7, H8 y H6. Estos aislamientos presentaron funciones de supervivencia inferiores y mortalidades tanto total como confirmada del 100 %, además de un elevado porcentaje de viabilidad. El aislamiento H8 no fue seleccionado debido a su menor productividad de conidios por placa, aspecto que no fue analizado cuantitativamente pero que se observó al momento de los raspados de las placas. Asimismo, se observó una esporulación notablemente menos abundante en las hormigas correspondientes a este tratamiento en comparación con los aislamientos H17, H7 y H6, lo cual también influyó en su no selección.

## Segundo bioensayo

En esta oportunidad, los tres aislamientos evaluados volvieron a presentar funciones de supervivencia total menores a la del control. Entre los tres aislamientos, el mejor desempeño se observó en H17, seguido por H7 y H6 (Figura 26).

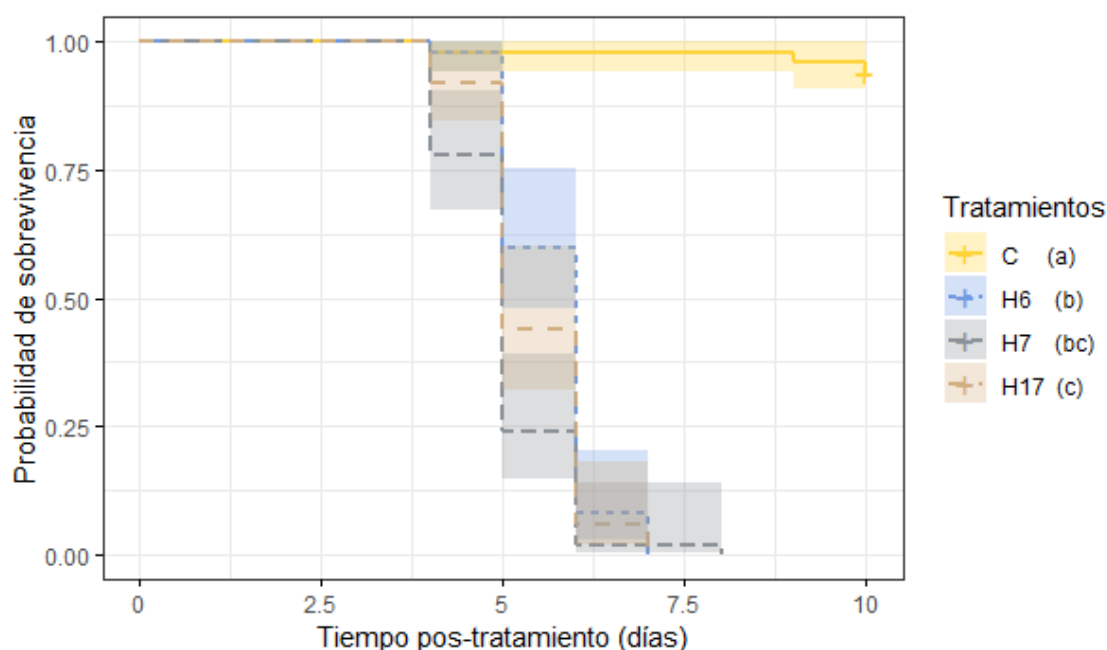


Figura 26. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de obreras mayores de *A. sexdens* tratadas con tres aislamientos locales de *Beauveria* spp. más un control (C). Las letras distintas, ubicadas entre paréntesis al costado de la leyenda de los tratamientos, indican diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Log-rank entre pares de curvas, con ajuste por el método de Bonferroni para mantener el  $\alpha$  igual a 0,05.

Esta vez, H17 presentó un tiempo letal medio igual a seis, un día más que los aislamientos H7 y H6 (Tabla 14), a diferencia del primer bioensayo donde este aislamiento fue el de menor tiempo letal medio.

Tabla 14. Tiempo letal medio de cada tratamiento en el bioensayo 2. No se pudo determinar el tiempo letal medio del tratamiento control (C) ya que presentó una supervivencia mayor al 50 % en el período evaluado de 10 días.

Tratamiento	Tiempo letal medio (días)	IC 95 % inferior	IC 95 % superior
H7	5	5	6
H6	5	5	5
H17	6	5	6
C	n/d (>10)		

Hubo diferencias entre los tratamientos tanto en mortalidad confirmada ( $\chi^2$ : 17,4; GL: 3; p-valor: 0,0006) como en mortalidad total ( $\chi^2$ : 18,6; GL: 3; p-valor: 0,0003). Los aislamientos H7 y H17 presentaron mejores desempeños en mortalidad confirmada

respecto a H6 en las comparaciones *post hoc*, y fueron iguales en mortalidad total (Tabla 15).

Tabla 15. Mortalidad confirmada y total de obreras mayores de *A. sexdens* enfrentadas a tres aislamientos locales de *Beauveria* spp. Los tratamientos con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Tratamiento	n	Mortalidad confirmada (%)			Mortalidad total (%)	
		Promedio $\pm$ D.E.	Mediana		Promedio $\pm$ D.E.	Mediana
C	5	0 $\pm$ 0	0	A	6 $\pm$ 5,5	10 a
H17	5	100 $\pm$ 0	100	C	100 $\pm$ 0	100 b
H7	5	100 $\pm$ 0	100	C	100 $\pm$ 0	100 b
H6	5	92 $\pm$ 4	90	B	100 $\pm$ 0	100 b

La viabilidad de los conidios fue superior al 90 % en los tres aislamientos, la diferencia entre ellos no fue significativa ( $\chi^2$ : 3,5; GL: 2; p-valor: 0,1767), a pesar de que H7 presentó un mayor promedio (Figura 27).

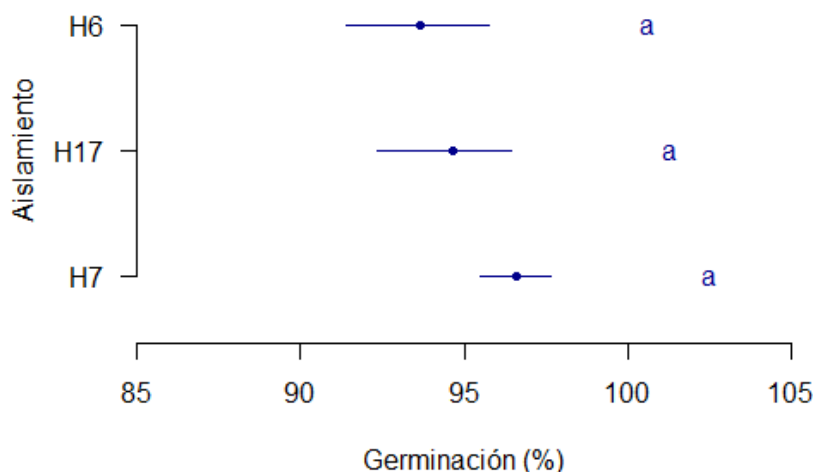


Figura 27. Porcentaje de germinación de conidios de los 11 aislamientos evaluados en el bioensayo 1. Barras con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Hommel para comparaciones múltiples.

## 5.4 DISCUSIÓN

En los bioensayos realizados se pudo comprobar que todos los aislamientos locales de *Beauveria* spp. obtenidos de *A. sexdens* fueron patogénicos en obreras mayores de esta especie en condiciones de laboratorio. Sin embargo, se encontraron diferencias entre los aislamientos en cuanto a características como la supervivencia, el tiempo letal medio, la

mortalidad confirmada y, en algunos casos, la viabilidad de los conidios. Además, aunque no se realizó un análisis cuantitativo, se pudo observar que algunos aislamientos presentaron una mayor producción de conidios por placa en comparación con otros. Estos factores influyeron en la selección final de los aislamientos de cada bioensayo, siendo H6, H7 y H17 los más efectivos en el primer bioensayo y H7 el mejor aislamiento en el segundo.

En el estudio realizado por Stefanelli et al. (2020), se observó que tanto *B. bassiana* como *Trichoderma hardzianum* Rifai tienen acción entomopatógena no solo sobre adultos, sino también sobre larvas y pupas de *A. sexdens* en condiciones de laboratorio. Estos autores encontraron TL50 entre 10 y 126 horas (0,4 - 5 días) para *B. bassiana* en obreras adultas, un poco menores en comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio, los cuales se ubicaron entre 3,5 y 6 días. Por otro lado, Loureiro y Monteiro (2005) reportaron TL50 aún menores (cerca de 3 días) en obreras de *A. sexdens* expuestas a dos aislamientos comerciales de *B. bassiana*. A pesar de esto, observaron mortalidades confirmadas solamente de entre 41 % y 50 % de las obreras tratadas, en contraste con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde la mortalidad confirmada fue del 90 % en el aislamiento de peor desempeño y del 100 % en los mejores aislamientos, para las hormigas provenientes de un solo nido.

En un estudio llevado a cabo con diversas especies de HCH del género *Acromyrmex*, Folgarait et al. (2020) encontraron evidencias claras de que, además de las características del aislamiento del hongo entomopatógeno, también influye la especie del hospedero en la capacidad de control del bioformulado, es decir, que algunas especies son más susceptibles que otras a un mismo aislamiento. Esto podría indicar que la baja mortalidad confirmada que se encontró en el estudio de Loureiro y Monteiro (2005) se deba a que los aislamientos comerciales utilizados no fueron suficientemente activos para la especie evaluada. En contraste, la alta mortalidad confirmada en obreras de *A. sexdens* observada en los 11 aislamientos de nuestro estudio se puede atribuir a que todos ellos fueron obtenidos a partir de esa misma especie de HCH provenientes de un solo nido.

Los hallazgos de este estudio sugieren que, a pesar de parasitar naturalmente a *A. sexdens*, los aislamientos presentaron diferencias de desempeño en los bioensayos. Algunos presentaron curvas de supervivencia que caen más aceleradamente, indicando

una menor variabilidad en el tiempo en que sucede la muerte del insecto luego de la adhesión de los conidios a la cutícula. También se encontraron diferencias en los porcentajes de mortalidad confirmada por la esporulación característica de *Beauveria* spp. sobre los cadáveres que rondaron el 90 % en los aislamientos menos activos, y el 100 % en los más activos. A pesar de no haber sido una variable de estudio, no se observaron comportamientos de higiene, como el autoacicalamiento o el acicalamiento mutuo, que fueran distintos a los observados en las hormigas del grupo de control. En aplicaciones a campo, la falta de acicalamiento, principalmente mutuo, podría limitar la propagación de los conidios del hongo entomopatógeno entre los integrantes de una colonia y, en consecuencia, disminuir el potencial de producir una epizootia que la mate (da Silva Camargo et al., 2017). El escenario de una limitada propagación de los conidios entre miembros de la colonia, sería más probable en el caso de bioformulados como cebo granulado, a comparación de polvos, por ejemplo. En el caso del cebo granulado que confina los conidios en los gránulos, estos entran en contacto con relativamente pocas obreras. En cambio, conidios formulados como polvo tendrían contacto con un mayor número de obreras y estructuras del interior de los nidos, facilitando su dispersión entre los individuos de la colonia. De todos modos, nuevos estudios deben realizarse en hormigas de diferentes nidos para evaluar si el acicalamiento y otros comportamientos de higiene varían al ser expuestas a distintos aislamientos de hongos entomopatógenos, y también cómo influyen esas interacciones entre hormigas sobre la mortalidad.

Los resultados obtenidos alientan a seguir investigando y evaluando en distintas condiciones los aislamientos obtenidos. En primer lugar, se propone evaluar el aislamiento H7 ante nidos de campo y con diferentes formas de aplicación. Una caracterización morfológica y molecular es un paso que no se pudo cumplir en el desarrollo de este objetivo, pero que se debe dar en el corto plazo para identificar fehacientemente a nivel de especie cada uno de los aislamientos logrados.

## CAPÍTULO 6: Efectividad de un aislamiento local del hongo entomopatógeno *Beauveria* sp. para el control en campo de nidos de *Atta sexdens*

### 6.1 INTRODUCCIÓN

Las colonias de las HCH tienen poblaciones muy numerosas, que pueden alcanzar varios millones de obreras (Fowler et al., 1986), y ser muy longevas ya que sobrepasan los 10 años de vida (Wirth et al., 2003). Estas hormigas han desarrollado comportamientos higiénicos altamente efectivos que previenen la propagación de enfermedades, como la eliminación de desechos, el acicalamiento individual y colectivo, el abandono de la colonia por parte de obreras enfermas (Hölldobler y Wilson, 1990; Bot et al., 2001). Incluso, se han reportado relaciones simbióticas con bacterias en su cutícula que les confieren una cierta inmunidad al ataque de microorganismos (Santos et al., 2004; Mattoso et al., 2012). En conjunto, estos mecanismos permiten a las HCH mantener la homeostasis de sus numerosas y longevas colonias y cultivar sin contaminaciones su principal fuente de alimento.

Al atacar los cultivos donde anidan, varias especies de HCH se transformaron en importantes plagas. En el caso de las forestaciones en el neotrópico, las HCH constituyen la principal plaga y, si no son manejadas adecuadamente, pueden comprometer la viabilidad económica de estos cultivos (Capítulos 3 y 4; Scherf et al., 2022a; Souza et al., 2011; Nuñez et al., 2020; Jiménez et al., 2021). Se emplean métodos químicos para su control, entre los cuales la formulación como cebo granulado es la más usada por su relación costo-beneficio (Nuñez et al., 2020; Sabbatini, 2017) y porque aún es aceptada por los organismos de certificación, a pesar de contener fipronil o sulfluramida (Forest Stewardship Council, 2019). Otras formulaciones utilizadas son los polvos secos que son insuflados con bombas manuales al interior de los nidos y la termonebulización (Montoya-Lerma et al., 2012; Bollazzi et al., 2014).

El cebo granulado consta de dos componentes principales, una sustancia atrayente y un insecticida (Gandra et al., 2016; Sabbatini, 2017). El atrayente debe ser específico para el tipo de insecto que se desea controlar, resistente a la degradación ambiental y no debe interferir con la efectividad del insecticida. Además, el insecticida debe actuar por ingestión ya que las hormigas lo ingieren al lamer el cebo para incorporarlo a la honguera y lo propagan por medio del acicalamiento. Es importante que el insecticida sea letal en bajas concentraciones, para que mantenga su efectividad en la transmisión

horizontal y vertical entre integrantes de la colonia. Un tipo de vehículo de los insecticidas es el polvo seco. Este método se compone de un insecticida y talco u otro aditivo como vehículo inerte que le da volumen. Para el control de HCH, es normalmente aplicado con bombas insufladoras manuales que permiten introducir el polvo en forma de nube en el interior de los hormigueros (Tarragó et al., 2017; Scherf et al., 2022b).

En el contexto de una búsqueda de sistemas de producción más sostenibles, el control biológico de plagas ha cobrado un especial interés. Se utilizan organismos vivos que pueden ser patógenos, parasitoides, depredadores o competidores de los organismos plaga. El control biológico se considera una técnica más sostenible y respetuosa con el medio ambiente que el control químico (Fischbein, 2012). Los antecedentes de trabajos sobre control biológico de las HCH se han centrado principalmente en hongos entomopatógenos (Jaccoud et al., 1999; Lopez y Orduz, 2003; Loureiro y Monteiro, 2005; Cardoso et al., 2012; Folgarait et al., 2020; Stefanelli et al., 2020; Folgarait y Goffré, 2021; De Souza Loureiro et al., 2022) y en parasitoides (Tonhasca et al., 2001; Elizalde y Folgarait, 2010; Elizalde y Folgarait, 2012; Folgarait, 2013; Pimentel et al., 2022).

Los hongos entomopatógenos son una estrategia muy interesante porque ya se han logrado casos exitosos en otras plagas propias de la agricultura (Alves y Lopes, 2008), y también porque se pueden lograr formulaciones similares a las de los productos químicos, lo que podría facilitar su implementación en escala productiva. En este sentido, *Beauveria* es el género de hongos entomopatógenos con el que más pruebas se hicieron para controlar las HCH, aunque, a campo únicamente fueron evaluadas formulaciones en forma de cebo que es una formulación desarrollada y con buen funcionamiento para sustancias que actúan por ingestión (Correa-Bueno et al., 2013; Andrade et al., 2002). No se encuentran casos de estudio a campo de bioformulaciones en polvo, a pesar de que la principal vía natural de ingreso de los hongos entomopatógenos es cuticular, es decir, por contacto (Mora et al., 2018; Mannino et al., 2019).

El objetivo de este capítulo fue evaluar en condiciones controladas de laboratorio la actividad de un aislamiento local de *Beauveria* sp. formulado como polvo seco y

determinar la efectividad del mismo aislamiento para el control de nidos de campo de *A. sexdens* en formulaciones como polvo y como cebo granulado.

## 6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para alcanzar la primera parte del objetivo de este capítulo, que corresponde al desarrollo de una formulación en polvo de hongos entomopatógenos, se utilizó tierra de diatomeas como vehículo para dar volumen a la formulación y de esta manera lograr una mayor cobertura una vez que sea aplicada a nidos de campo. Además, la tierra de diatomeas tiene poder insecticida, debido a que provoca la abrasión de la cutícula de los insectos provocando su muerte por deshidratación (Korunic, 1998), propiedad que resulta interesante para el control de HCH dado que se han reportado simbiosis con bacterias sobre su cutícula que actúan como defensa para las hormigas ante infecciones por microorganismos (Santos et al., 2004; Mattoso et al., 2012). Esta abrasión podría generar lesiones que rompen esa capa de bacterias y, en consecuencia, mejorar las posibilidades de penetración de los hongos entomopatógenos.

El poder insecticida de las tierras de diatomeas varía según el yacimiento de donde proviene (Korunic, 1998). En Argentina se comercializa tierra de diatomeas proveniente de yacimientos locales, de los cuales no existen antecedentes de trabajos donde se haya determinado su poder insecticida. Por ello, en este capítulo se incluye un ensayo inicial donde se evaluó el poder insecticida de la tierra de diatomeas de origen argentino, comparado con otra de distinta procedencia de la cual se conoce su poder insecticida pero que no se dispone comercialmente en el país.

### *Obtención de las hormigas para los bioensayos*

Fueron colectadas obreras mayores de un hormiguero activo de *A. sexdens* del Campo Anexo Laharrague del I.N.T.A. E.E.A. Montecarlo. Las mismas, junto con algo de tierra húmeda de los montículos, fueron depositadas en el interior de recipientes plásticos de 25x40x15 cm con tapa aire-permeable, previamente lavados y desinfectados con alcohol 70 % y secados al sol directo. Los recipientes con hormigas fueron transportados al laboratorio, donde se dejaron reposar a 24 °C durante alrededor de 15 h.

### *Selección de tierra de diatomeas*

Con el objetivo de determinar si la tierra de diatomeas proveniente de yacimientos argentinos (DiatomiD®) tiene efectos similares a la marca comercial PosturaSec® (Vet

Science Biosolutions Ltd.), se realizó un bioensayo comparando tres concentraciones de estas dos marcas y dos tipos de controles: sin aplicación y con aplicación de fécula de maíz como polvo inerte (Tabla 16). La tierra de diatomeas Postura Sec® se ha evaluado en investigaciones científicas en Brasil ante otros artrópodos (Alves et al., 2019; Alves et al., 2020) pero actualmente no se encuentra disponible comercialmente en Argentina.

Tabla 16. Tratamientos del bioensayo de selección de tierra de diatomeas.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Origen de la tierra de diatomeas</b>
C1	Sin aplicación	---
C2	Fécula de maíz 100 %	---
T1	PosturaSec® 100 %	Brasil
T2	PosturaSec® + Fécula de maíz (1:2)	Brasil
T3	PosturaSec® + Fécula de maíz (2:1)	Brasil
T4	DiatomiD® 100 %	Argentina
T5	DiatomiD® + Fécula de maíz (1:2)	Argentina
T6	DiatomiD® + Fécula de maíz (2:1)	Argentina

Al momento de iniciar la aplicación de los tratamientos, los recipientes con las hormigas fueron colocados por unos minutos en heladera hasta que el grupo de hormigas pasó al estado de quiescencia. De esta manera, se pudo seleccionar de manera ordenada a las obreras mayores que no tuvieran signos de lesiones o desmembramientos, las cuales fueron transferidas a vasos plásticos con tapa en grupos de 10 individuos, aguardando la aplicación del respectivo tratamiento. Las hormigas obreras mayores de *A. sexdens*, dispuestas en grupos de 10 individuos, se hicieron caminar por 1 min en el interior de recipientes con el fondo cubierto por 1 cm del polvo correspondiente a su respectivo tratamiento, luego se quitó el exceso de polvo agitando las hormigas en un vaso plástico desinfectado. En seguida, el grupo de 10 hormigas fue transferido a placas de Petri desinfectadas y con el fondo revestido con papel de filtro humedecido con agua destilada, así se logró el ambiente húmedo necesario para el correcto desarrollo de las hormigas. Cada tratamiento contó con cinco placas con 10 obreras cada una, totalizando 40 placas y 400 hormigas en evaluación. Las placas fueron mantenidas en un estante en el interior del laboratorio, con incidencia de luz natural indirecta, temperatura de 25 °C, y humedad relativa de alrededor del 80 %.

Por la velocidad observada en los decesos, las evaluaciones de este bioensayo se realizaron cada 4 h y durante 10 días, totalizando 60 evaluaciones donde se registró el número de hormigas muertas por placa.

*Efecto combinado del aislamiento de Beauveria sp. y la tierra de diatomeas*

Un segundo bioensayo en laboratorio fue establecido para determinar la efectividad de la combinación del aislamiento H7 de *Beauveria* sp., elegido por haber sido el más efectivo en los estudios detallados en el Capítulo 5, y la tierra de diatomeas sobre *A. sexdens*, donde se evaluaron formulaciones líquidas y en polvo (Tabla 17).

Tabla 17. Tratamientos del bioensayo de evaluación del efecto combinado de *Beauveria* sp. y tierra de diatomeas.

Tratamiento	Descripción	Concentración de conidios
C	Sin aplicación	---
T1	Suspensión de H7 y tierra de diatomeas 5 % (p/v)	$1 \times 10^8$ conidios/ml
T2	Suspensión de H7 y tierra de diatomeas 10 % (p/v)	$1 \times 10^8$ conidios/ml
T3	Polvo de H7 y tierra de diatomeas	$1 \times 10^8$ conidios/g
T4	Polvo de H7 y fécula de maíz	$1 \times 10^8$ conidios/g
T5	Polvo puro de H7	$1,9 \times 10^9$ conidios/g

En los tratamientos correspondientes a suspensiones líquidas (T1 y T2), se realizó la aplicación tópica con rociador de 1 ml de una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios de H7 por mililitro de Tween 80 (0,01 %) y tierra de diatomeas, sobre cada grupo de 10 obreras mayores de *A. sexdens*. Las hormigas posteriormente fueron alojadas en placas de Petri desinfectadas y con el fondo revestido con papel de filtro humedecido con agua destilada, con el fin de brindar un ambiente húmedo para el correcto desarrollo de las hormigas y del hongo.

En el caso de los tratamientos con polvos (T3, T4 y T5), las hormigas obreras mayores de *A. sexdens*, dispuestas en grupos de 10 individuos, se hicieron caminar por 1 min en el interior de recipientes con el fondo cubierto por 1 cm del polvo correspondiente a su respectivo tratamiento. Luego, se les quitó el exceso de polvo por agitado en un vaso plástico desinfectado, del cual el grupo de 10 hormigas fue transferido a placas de Petri.

Las mismas estaban desinfectadas, y tenían el fondo revestido con papel de filtro humedecido con agua destilada, con el fin de brindar un ambiente húmedo para el correcto desarrollo de las hormigas y del hongo.

Cada tratamiento contó con cinco placas con 10 obreras cada una, totalizando 30 placas y 300 hormigas en evaluación. Las placas fueron mantenidas en un estante en el interior del laboratorio, con incidencia de luz natural indirecta, temperatura de 25 °C, y humedad relativa de alrededor del 80 %.

Las evaluaciones del bioensayo se realizaron cada 24 horas y durante 10 días, registrando el número de hormigas muertas por placa. Las hormigas muertas se retiraron con pinza entomológica desinfectada y se desinfectaron superficialmente por inmersión durante 30 segundos en alcohol 70 % y doble enjuagado en agua destilada estéril.

Posteriormente, los cadáveres se depositaron en el interior de placas de Petri desinfectadas, con el fondo revestido con papel absorbente seco, rotuladas con la fecha de muerte, tratamiento y repetición correspondiente, y dispuestas en una cámara húmeda realizada con un contenedor plástico de 45x25x15 cm, de cierre hermético y con el fondo cubierto con una plancha de goma espuma humedecida con agua. El recipiente fue envuelto para generar oscuridad en su interior, la cual, combinada con la humedad relativa alta, favorece la esporulación característica de *Beauveria* sobre las articulaciones de las hormigas. A partir del quinto día posterior al primer registro de muerte en el bioensayo, y hasta 10 días después de la última muerte, diariamente se inspeccionó la cámara húmeda para confirmar si la muerte de las hormigas fue provocada por la acción del hongo entomopatógeno, observando y registrando en planillas el número de cadáveres con la presencia de esporulación en sus articulaciones.

#### *Elección de los co-formulantes del hongo entomopatógeno*

Se evaluaron a campo dos formulaciones con diferentes vías de ingreso al insecto, por ingestión y por contacto. Para la primera se empleó la formulación más comúnmente utilizada en el control químico y biológico, que es el cebo granulado con pulpa cítrica como atrayente (Phillips et al., 1976; Verza et al., 2006), cuya compatibilidad con hongos ya ha sido demostrada por Herrera et al. (2013). Para la segunda, se evaluó en dos bioensayos en laboratorio, y posteriormente a campo, el efecto de la tierra de diatomeas como agente mineral co-formulante del hongo entomopatógeno para el control de *A. sexdens*.

### *Sitio de estudio de las pruebas a campo*

El estudio se llevó a cabo en una plantación agroforestal, donde el cultivo forestal es kiri (*Pa. tomentosa*) y el agrícola la yerba mate (*I. paraguariensis*), perteneciente a La Misionera S.A., ubicada en el municipio de Caraguatay de la provincia de Misiones, Argentina. El clima de la región es subtropical y húmedo, con heladas invernales y una precipitación anual promedio de alrededor de 1.800 mm, con un régimen isohigro. El suelo es del tipo Kandiuultes, arcilloso y bien drenado (Fernández et al., 2015). Se eligió este lugar porque la plantación presenta una alta densidad de nidos de *A. sexdens* y no se habían hecho aplicaciones de insecticida previo ni durante el estudio que pudieran interferir con los resultados.

### *Preparación de los bioformulados*

Para elaborar el cebo granulado, se tamizó la pulpa de naranja deshidratada y triturada utilizando dos tamices de malla 4 y 6, obteniendo una pulpa con partículas de tamaño entre 4,75 y 3,35 mm respectivamente. Luego, se pesó la pulpa tamizada y se almacenó en un recipiente plástico con cierre hermético previamente desinfectado.

Posteriormente, se agregaron conidios del aislamiento local H7 a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios por gramo de pulpa, se tapó el recipiente y se agitó enérgicamente durante 5 minutos. Finalmente, se almacenó en oscuridad durante aproximadamente 18 horas. Para su uso en campo, se fraccionó el cebo en dosis de 10 g y se colocó en recipientes plásticos con tapa previamente desinfectados.

Para elaborar el polvo seco, se pesó la cantidad necesaria de tierra de diatomeas (DiatomiD®) y se almacenó en un recipiente plástico con cierre hermético previamente desinfectado. Luego se agregaron conidios del aislamiento local H7 a razón de  $1 \times 10^8$  conidios por gramo de polvo, y se tapó el recipiente para agitarlo enérgicamente durante 5 minutos. Posteriormente, se almacenó en oscuridad durante aproximadamente 18 horas. Para su uso en campo, se fraccionó el polvo en dosis de 10 gramos en recipientes plásticos desinfectados con tapa.

### *Evaluación a campo*

Se realizó una búsqueda de 15 nidos de *A. sexdens* que tuvieran cinco bocas. Se estima, por conocimiento del lugar, que la edad de los nidos fue de aproximadamente un año. Cada nido fue marcado con una estaca central de madera, asimismo, las bocas fueron marcadas con banderines con su respectivo número. Se definieron tres tratamientos para

el experimento, control (sin ningún tipo de aplicación), cebo (aislamiento local H7 de *Beauveria* sp. y pulpa deshidratada de naranjas a una dosis de 10 g por boca) y polvo (aislamiento local H7 de *Beauveria* sp. y tierra de diatomeas a una dosis de 10 g por boca). A cada hormiguero le fue asignado al azar un tratamiento, de esta manera, se contó con cinco repeticiones (hormigueros) por tratamiento.

A los nidos del tratamiento cebo se les ofreció una dosis de 10 g del cebo granulado por boca. La dosis fue colocada al costado de la boca (Figura 28 a), por la mañana, cuando los hormigueros estaban en actividad o comenzando la misma, evitando la incidencia de radiación solar directa sobre el cebo. A las 24 h se evaluó la cantidad total de cebo ingresada por las hormigas en cada boca.

Para el tratamiento del bioformulado en polvo se empleó una bomba insufladora manual, previamente desinfectada, en cuyo depósito se agregaron las dosis de 10 g del bioformulado. En cada una de las cinco bocas del hormiguero, se insufló una dosis de 10 g (Figura 28 b).



Figura 28. a) Detalle del lugar de aplicación del bioformulado cebo. b) Detalle de la aplicación del bioformulado polvo.

Se repitieron las aplicaciones de los dos tratamientos en la tercera y en la séptima semana, empleando la misma metodología que en la primera aplicación, aunque

solamente fueron tratadas aquellas bocas que no habían sido abandonadas. En la Tabla 18 se muestran las dosis aplicadas a cada hormiguero.

Tabla 18. Número de bocas activas y dosis aplicadas a cada nido de *A. sexdens*.

Tratamiento	Nido	Aplicación 1: Semana 0		Aplicación 2: Semana 3		Aplicación 3: Semana 7	
		Bocas activas	Dosis por nido (g)	Bocas activas	Dosis por nido (g)	Bocas activas	Dosis por nido (g)
Cebo	1	5	50	5	50	2	20
Cebo	2	5	50	5	50	3	30
Cebo	3	5	50	5	50	2	20
Cebo	4	5	50	5	50	5	50
Cebo	5	5	50	5	50	2	20
Polvo	1	5	50	4	40	1	10
Polvo	2	5	50	2	20	0	0
Polvo	3	5	50	0	0	0	0
Polvo	4	5	50	4	40	3	30
Polvo	5	5	50	4	40	0	0

Las evaluaciones de la actividad de cada boca se realizaron semanalmente hasta la semana 13, registrando el nivel de actividad según lo detallado en la Tabla 19, momento en que se realizó la evaluación final. Se recolectaron obreras vivas en cada boca activa de los hormigueros del experimento, esto se hizo en la tercera semana (justo antes de la segunda aplicación), en la quinta semana y en la séptima (antes de la tercera aplicación de los tratamientos). Las obreras, fueron alojadas en el interior de placas de Petri estériles y puestas en cámara húmeda durante 7 días para determinar si *Beauveria* sp. se estaba diseminando entre las obreras en niveles epizooticos.

Tabla 19. Escala utilizada para la evaluación de la actividad de las bocas de los hormigueros.

Estado	Descripción
Muerta	Muerto. Boca abandonada.
Inactiva	Sin hormigas a la vista, pero con rastros de actividad reciente.
Baja actividad	Pocas obreras a la vista, mayormente se encuentran al borde de la boca.
Media actividad	Obreras que entran y salen de la boca, aunque no hay forrajeo o el mismo es incipiente, puede haber excavación.

Alta            Obreras entran y salen continuamente de la boca, la mayoría que entran lo  
actividad    hacen con material vegetal.

---

### *Diseño experimental y análisis estadístico*

Para los dos bioensayos en laboratorio se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado. Para el análisis estadístico también se utilizó el estimador de Kaplan-Meier para calcular las funciones de supervivencia de cada tratamiento, considerándose cada hormiga como unidad experimental ( $n=50$ ). Se realizaron comparaciones entre pares de curvas con la prueba de Log-rank (o Mantel Haenszel), cuyos p-valores fueron ajustados con el método de Bonferroni para mantener un nivel de significación global del 5 %. Además, a partir de estas funciones, se determinó el tiempo letal medio con sus respectivos intervalos de confianza inferior y superior de la mediana, que corresponde al tiempo necesario para obtener una probabilidad de muerte del 50 %.

Para el análisis del conteo de hormigas muertas por placa, total y confirmadas (solo para el bioensayo cuyos tratamientos incluyeron hongos entomopatógenos), entre tratamientos al décimo día de las evaluaciones, se consideró a cada placa de Petri con un grupo de 10 obreras mayores ( $n=5$ ) como la unidad experimental. Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y se utilizó el método de Bonferroni para la corrección de los p-valores. En los casos donde no se cumplía con el supuesto estadístico de homocedasticidad, se realizó la transformación  $\text{sen}^{-1}\left(\frac{x}{10}\right)$ .

A partir de los datos de las pruebas de campo, se realizó la prueba de Chi cuadrado de Pearson para determinar si existe asociación entre los tratamientos y los niveles de actividad de las bocas de los nidos. Se realizó un ANOVA para comparar la cantidad de cebo acarreada por los hormigueros en cada aplicación. Mediante la prueba de Chi cuadrado de Pearson se determinó si existe asociación entre el tratamiento recibido y la muerte de nidos, la misma prueba se empleó para las comparaciones entre pares de tratamientos simulando p valores con la prueba de Monte Carlo ( $n=2000$ ).

Finalmente, para evaluar el porcentaje de hormigas colectadas con muerte confirmada por *Beauveria* sp., se ajustó un modelo de medidas repetidas en el tiempo utilizando modelos lineales de efectos mixtos con el paquete *nlme* (Pinheiro et al., 2022) del

software R versión 4.2.2 (R, 2022), considerando los tratamientos y la semana de evaluación como variables de efectos fijos, y el nido como variable de efecto aleatorio.

Todos los análisis y figuras se realizaron con el software estadístico R (versión 4.2.2).

### 6.3 RESULTADOS

#### *Selección de tierra de diatomeas*

Todos los tratamientos con tierra de diatomeas mostraron funciones de supervivencia significativamente menores a los dos controles, sin aplicación y fécula de maíz. Entre los tratamientos con tierra de diatomeas, los de menores funciones de supervivencia fueron los de origen argentino, particularmente T4 y T6 (100 % y 66 %, respectivamente) (Figura 29). Estos mismos tratamientos fueron los que presentaron menores tiempos letales medios, así como se observa en la Tabla 20. En los seis tratamientos con diatomeas, se observó una caída acelerada en la probabilidad de supervivencia entre las 72 y 144 h (3° y 6° día, respectivamente) (Figura 29).

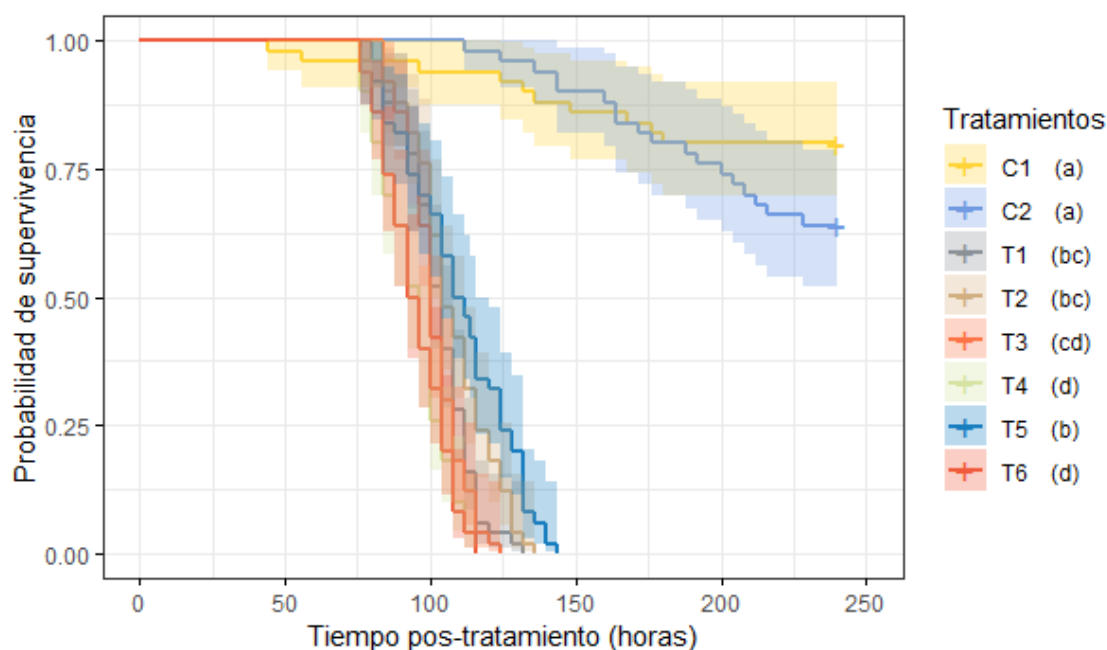


Figura 19. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de obreras mayores de *A. sexdens* tratadas con tierra de diatomeas. C1: sin aplicación, C2: fécula de maíz 100 %, T1: PosturaSec® 100 %, T2: PosturaSec® + Fécula de maíz (1:2), T3: PosturaSec® + Fécula de maíz (2:1), T4: DiatomiD® 100 %, T5: DiatomiD® + Fécula de maíz (1:2), T6: DiatomiD® + Fécula de maíz (2:1). Las letras distintas, ubicadas entre paréntesis al costado de la leyenda de los tratamientos, indican diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Log-rank entre pares de curvas, con ajuste por el método de Bonferroni para mantener el  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabla 20. Tiempo letal medio de cada tratamiento. No se pudo determinar el tiempo letal medio de los controles (C1 y C2) ya que presentó una supervivencia mayor al 50 % en el período evaluado de 10 días. C1: sin aplicación, C2: fécula de maíz 100 %, T1: PosturaSec® 100 %, T2: PosturaSec® + Fécula de maíz (1:2), T3: PosturaSec® + Fécula de maíz (2:1), T4: DiatomiD® 100 %, T5: DiatomiD® + Fécula de maíz (1:2), T6: DiatomiD® + Fécula de maíz (2:1).

Tratamiento	Tiempo letal medio (horas)	IC 95 % inferior	IC 95 % superior
T6	94	92	100
T5	110	104	120
T4	96	92	100
T3	100	100	104
T2	104	100	112
T1	104	100	108
C2	n/d (>240)		
C1	n/d (>240)		

Todos los tratamientos con tierra de diatomeas presentaron mortalidades del 100 % a las 240 h (10 días), significativamente mayores que los dos controles evaluados ( $\chi^2$ : 38,6; GL: 7; p-valor: <0,0001) (Tabla 21). A pesar de que se encontraron diferencias en las funciones de supervivencia de las obreras mayores de *A. sexdens* entre los tratamientos con tierra de diatomeas, no se presentaron diferencias significativas en la mortalidad de las hormigas entre los dos orígenes ni en las mezclas a distintas proporciones con fécula de maíz.

Tabla 21. Mortalidad total de obreras mayores de *A. sexdens* tratadas con tierra de diatomeas. C1: sin aplicación, C2: fécula de maíz 100 %, T1: PosturaSec® 100 %, T2: PosturaSec® + Fécula de maíz (1:2), T3: PosturaSec® + Fécula de maíz (2:1), T4: DiatomiD® 100 %, T5: DiatomiD® + Fécula de maíz (1:2), T6: DiatomiD® + Fécula de maíz (2:1). Los tratamientos con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Tratamiento	n	Mortalidad (%)	
		Promedio $\pm$ D.E.	Mediana
C1	5	20 $\pm$ 7	20 A
C2	5	36 $\pm$ 9	30 B
T1	5	100 $\pm$ 0	100 C
T2	5	100 $\pm$ 0	100 C
T3	5	100 $\pm$ 0	100 C
T4	5	100 $\pm$ 0	100 C
T5	5	100 $\pm$ 0	100 C
T6	5	100 $\pm$ 0	100 C

Los resultados de este bioensayo indican que la tierra de diatomeas disponible comercialmente en Argentina y proveniente de yacimientos nacionales, presenta efectividad similar a productos que ya han sido evaluados en trabajos científicos ante

otros artrópodos. Por ello, se decide utilizar este producto de la marca DiatomiD® en los siguientes bioensayos.

#### *Efecto combinado del aislamiento de Beauveria sp. y la tierra de diatomeas*

Los tratamientos planteados en este bioensayo han demostrado tener efectos significativos en las funciones de supervivencia. Donde T5, polvo puro de conidios del aislamiento H7, fue el tratamiento que presentó una función de supervivencia que se diferenció significativamente de los demás, a excepción del T2 (Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 10 %), que presentó cruzamientos con las demás curvas, mostrando diferencias solamente con el control, pero no con los demás tratamientos. Le siguen en desempeño al formulado puro, las formulaciones en polvo con tierra de diatomeas (T3) y con fécula (T4). La suspensión de H7 + tierra de diatomeas 5 % (T1), a pesar de ser significativa, fue la que presentó menor diferencia con el control (Figura 30).

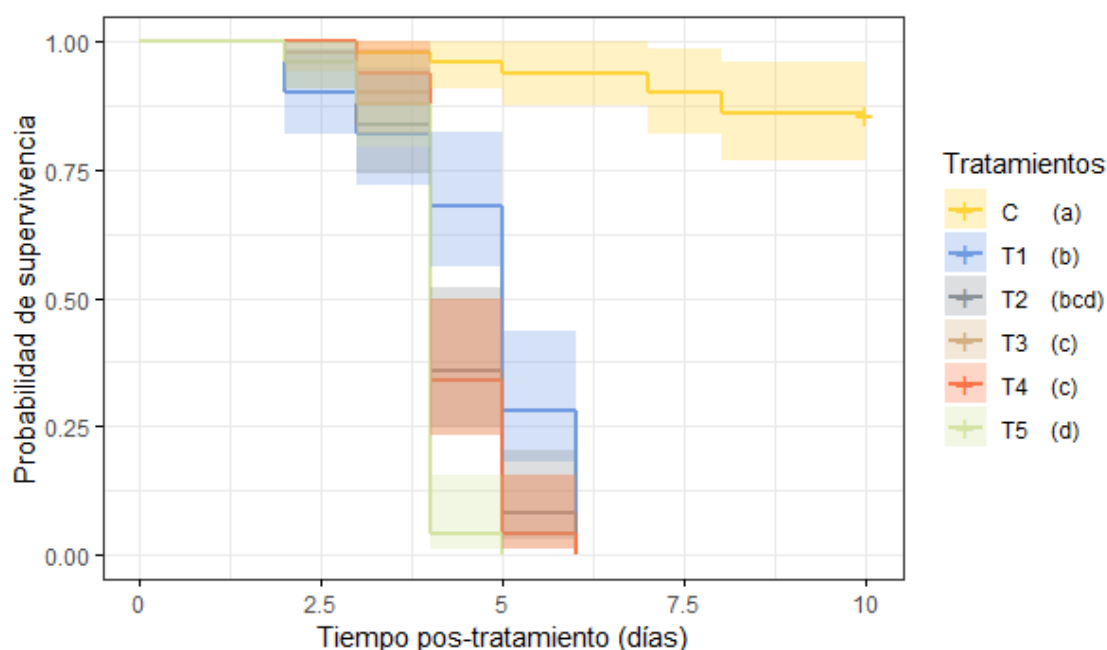


Figura 30. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de obreras mayores de *A. sexdens* tratadas con diferentes formulaciones del aislamiento H7 de *Beauveria* sp. C: control. T1: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 5 %, T2: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 10 %, T3: Polvo de H7 + tierra de diatomeas, T4: Polvo de H7 + fécula de maíz, T5: Polvo puro de H7. Las letras distintas, ubicadas entre paréntesis al costado de la leyenda de los tratamientos, indican diferencias estadísticas significativas por la prueba de Log-rank entre pares de curvas, con ajuste por el método de Bonferroni para mantener el  $\alpha$  igual a 0,05.

El tiempo letal medio fue semejante entre todas las formulaciones, siendo de cinco días para el formulado líquido de H7 más 5 % de tierra de diatomeas (T1), y de cuatro días para los demás tratamientos. En el control no se pudo determinar el tiempo letal medio

porque no se alcanzó el 50 % de la mortalidad dentro de los 10 días de evaluación del experimento (Tabla 22).

Tabla 22. Tiempo letal medio de cada tratamiento. No se pudo determinar el tiempo letal medio del control ya que presentó una supervivencia mayor al 50 % en el período evaluado de 10 días. C: control. T1: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 5 %, T2: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 10 %, T3: Polvo de H7 + tierra de diatomeas, T4: Polvo de H7 + fécula de maíz, T5: Polvo puro de H7

Tratamiento	Tiempo letal medio (días)	IC 95 % inferior	IC 95 % superior
T5	4	4	4
T4	4	4	5
T3	4	4	5
T2	4	4	5
T1	5	5	5
C	n/d (>10)		

Los tratamientos tuvieron efectos sobre la mortalidad total ( $\chi^2$ : 28,8; GL: 5; p-valor: <0,0001) y sobre la mortalidad confirmada ( $\chi^2$ : 16,4; GL: 5; p-valor: 0,0058). En la mortalidad total todos los formulados presentaron igual desempeño entre sí con mortalidades del 100 % en todos los casos. Por otro lado, al comparar la mortalidad confirmada, el formulado de suspensión líquida del aislamiento H7 + 10 % de tierra de diatomeas (T2) presentó el menor desempeño, sin poder diferenciarse del control. Todas las demás formulaciones tuvieron mortalidades confirmadas estadísticamente iguales (Tabla 23).

Tabla 23. Mortalidad total y confirmada de obreras mayores de *A. sexdens* tratadas con diferentes formulaciones del aislamiento H7 de *Beauveria* sp. Los tratamientos con letras en común no son estadísticamente diferentes, nivel de significancia ajustado por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. C: control. T1: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 5 %, T2: Suspensión de H7 + tierra de diatomeas 10 %, T3: Polvo de H7 + tierra de diatomeas, T4: Polvo de H7 + fécula de maíz, T5: Polvo puro de H7

Tratamiento	n	Mortalidad confirmada (%)		Mortalidad total (%)	
		Promedio $\pm$ D.E.	Mediana	Promedio $\pm$ D.E.	Mediana
C	5	0 $\pm$ 0	0 a	14 $\pm$ 5	10 a
T1	5	94 $\pm$ 9	100 b	100 $\pm$ 0	100 b
T2	5	72 $\pm$ 24	70 ab	100 $\pm$ 0	100 b
T3	5	94 $\pm$ 5	90 b	100 $\pm$ 0	100 b
T4	5	94 $\pm$ 5	90 b	100 $\pm$ 0	100 b
T5	5	92 $\pm$ 4	90 b	100 $\pm$ 0	100 b

A la luz de los resultados de este bioensayo, para las evaluaciones en hormigueros de *A. sexdens* del campo se decidió utilizar la formulación utilizada en el T3 (formulación en polvo del aislamiento H7 y tierra de diatomeas). Esta formulación presentó niveles de

mortalidad confirmada estadísticamente iguales a los demás tratamientos y un menor tiempo letal medio (al igual que T2, T4 y T5). Si bien el polvo puro de H7 (T5) tuvo un mejor desempeño en las funciones de supervivencia, al ser puro, tendría costos muy altos de aplicación sobre hormigueros en campo. El tratamiento T4 también tiene potencial de ser evaluado a campo, pero la fécula de maíz utilizada como su co-formulante tiene dos desventajas frente a la tierra de diatomeas: mayor costo y no lesiona la cutícula de los insectos.

### *Evaluación a campo*

Se encontró asociación significativa entre los tratamientos del experimento y la actividad de los hormigueros (GL: 8;  $\chi^2$ : 48,072; p-valor: <0,001). Durante la primera semana de evaluación, la actividad fue similar entre todos los tratamientos. Sin embargo, a medida que transcurrían las semanas, los hormigueros tratados con los bioformulados exhibieron niveles más bajos de actividad en comparación con el control. La aplicación del bioformulado en polvo resultó en la disminución más acelerada de la actividad de los hormigueros en comparación con el cebo (Figura 31).

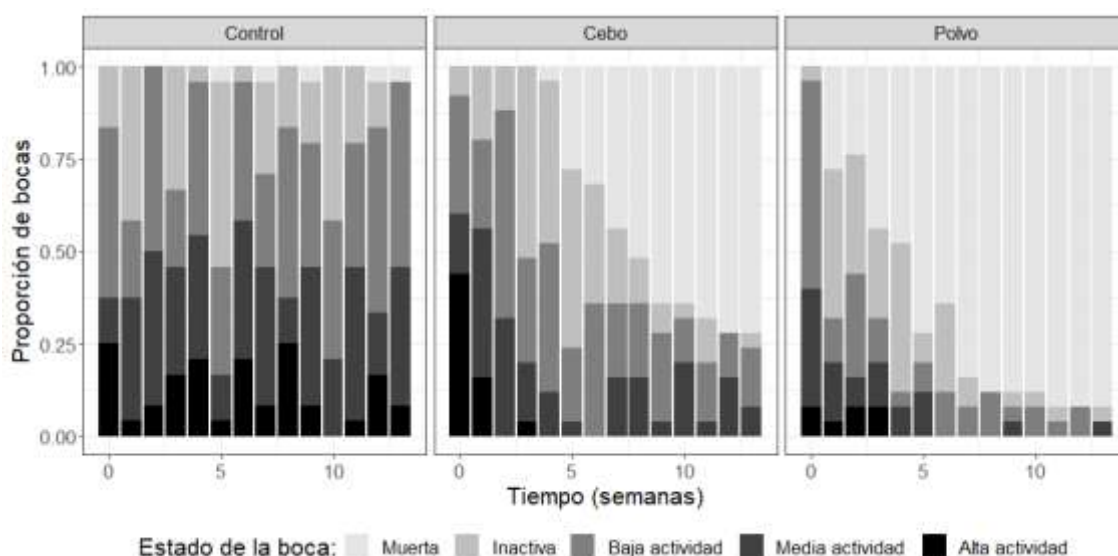


Figura 31. Niveles de actividad en las bocas de los nidos de campo de *A. sexdens* en el transcurso de las evaluaciones semanales del experimento.

Con respecto al tratamiento cebo, se observaron buenos niveles de aceptación del bioformulado, por encima del 82 % en todas las aplicaciones. A pesar de que las diferencias en el acarreo en las tres aplicaciones no fueron estadísticamente diferentes (GL= 2; F= 0,236; p= 0,79), se observó que el mejor nivel de aceptación del cebo se produjo en la tercera aplicación (Figura 32). Esto indica que *A. sexdens* no sería capaz

de asociar la incorporación del cebo a la honguera con la aparición de obreras infectadas por *Beauveria* sp.

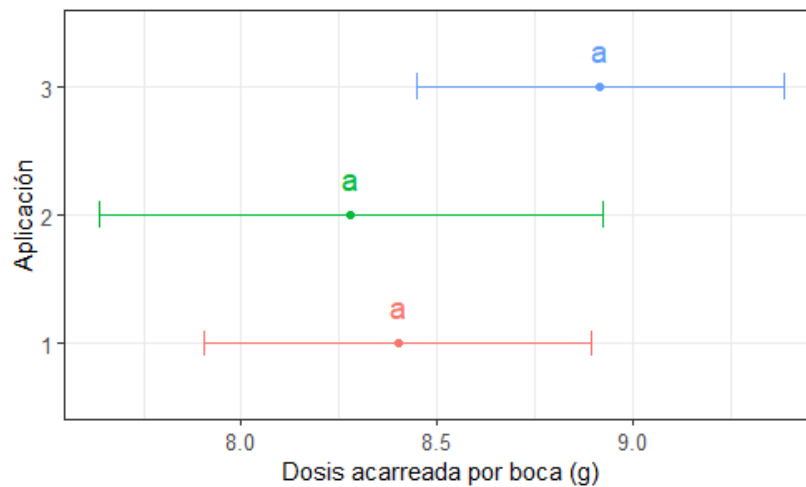


Figura 32. Cantidad de dosis acarreada por boca en cada una de las tres aplicaciones de este bioformulado.

En la última evaluación, que se realizó en la semana 13, se determinó que estaban muertos dos nidos del tratamiento correspondiente a la aplicación de cebo y cuatro de polvo, mientras que en el control no se registró muerte de nidos. La prueba de Chi cuadrado de Pearson indicó que existe asociación significativa entre la aplicación de los tratamientos y la supervivencia de los nidos (GL: 2;  $\chi^2$ : 6,667; p-valor: 0,036). Sólo el tratamiento con bioformulados en polvo se diferenció estadísticamente del control por presentar menor supervivencia de nidos, mostrándose como el tratamiento más efectivo en el período y condiciones evaluadas (Figura 33).

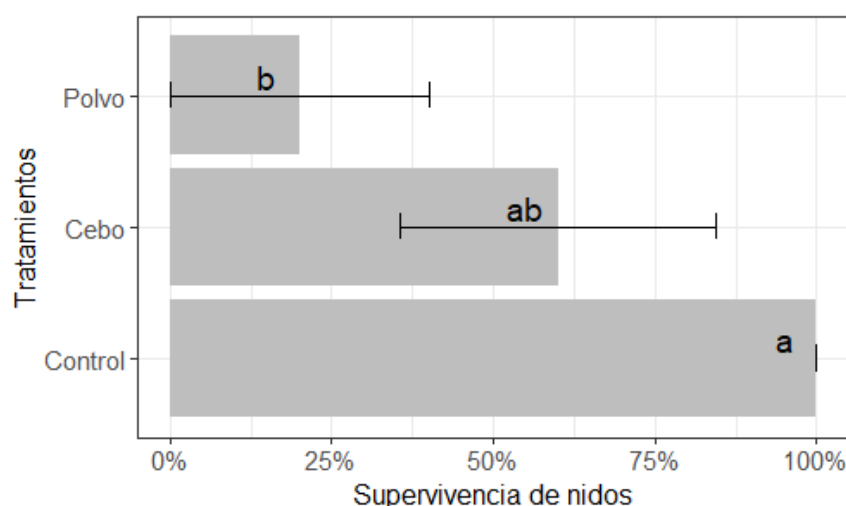


Figura 33. Supervivencia de nidos de campo de *A. sexdens* a las 13 semanas posteriores a la primera aplicación de los tratamientos. Letras en común en las barras indican que no existen diferencias estadísticas significativas (GL: 2;  $\chi^2$ : 6,7; p-valor: 0,036)

El porcentaje de hormigas con muerte confirmada por infección por *Beauveria* sp. también fue afectado por los tratamientos. Analizados como medidas repetidas en el tiempo, se encontró que el tiempo afectó significativamente al porcentaje de hormigas con muerte confirmada por infección por *Beauveria* sp., aunque la interacción entre el tratamiento y el tiempo no lo hizo (Tabla 24). El modelo de medidas repetidas en el tiempo con mejor ajuste fue el de estructura de correlación autorregresiva de orden uno para los efectos aleatorios.

Tabla 24. Análisis de la varianza del modelo ajustado de medidas repetidas en el tiempo.

	GL	F	P
(Intercept)	1	116,9	< 0,0001
Tratamiento	2	18,5	< 0,0001
Semana	2	25,7	< 0,0001
Tratamiento * Semana	4	1,7	0,1746

En la primera colecta, realizada en la tercera semana de evaluación, justo antes de la segunda aplicación de los bioformulados, se encontraron los mayores porcentajes de muerte de obreras confirmada por la acción de *Beauveria* sp. En este momento, el tratamiento de polvo presentó un 74 % de obreras con muerte confirmada, seguido por el tratamiento de cebo con un 55 %, mientras que el control registró un 20 %. Los porcentajes disminuyeron en las colectas posteriores (Figura 34).

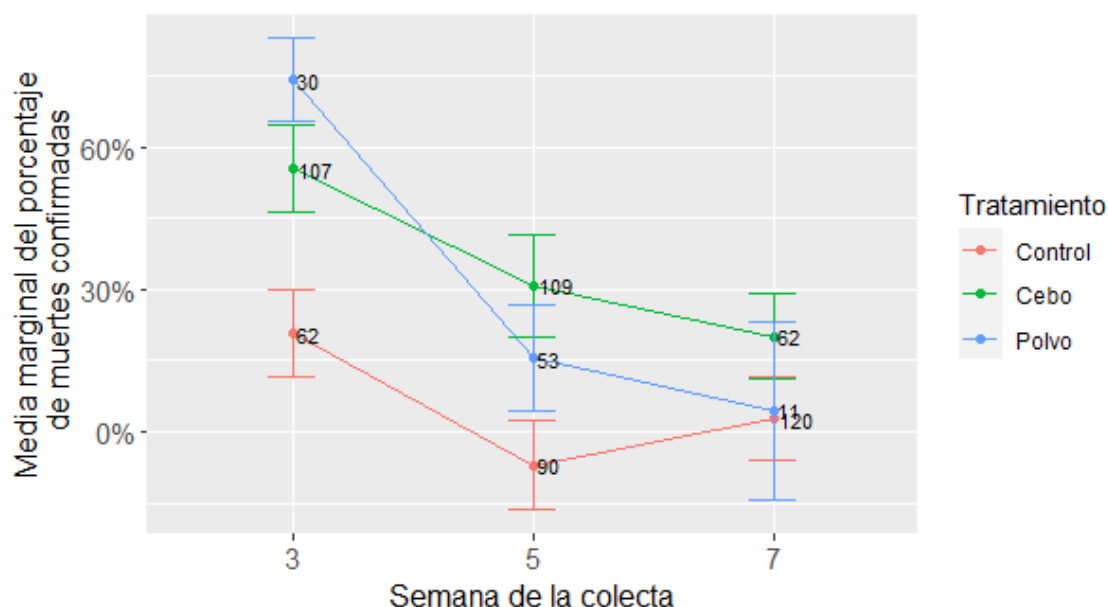


Figura 34. Porcentaje de obreras de *A. sexdens* con muerte confirmada por la acción de *Beauveria* sp. en cada una de las tres colectas. Las barras corresponden al desvío estándar del modelo. Los números indican la cantidad total de obreras recolectadas para el correspondiente tratamiento y semana.

## 6.4 DISCUSIÓN

En este capítulo se demostró que la tierra de diatomeas de yacimientos argentinos tiene un efecto similar sobre la mortalidad de obreras mayores de *A. sexdens* a la tierra de diatomeas evaluados en estudios de Brasil (Alves et al., 2019; Alves et al., 2020). También se comprobó que es compatible la combinación de un aislamiento local de *Beauveria* sp. con tierra de diatomeas. La formulación en polvo seco de la combinación del aislamiento H7 con tierra de diatomeas presentó una función de supervivencia significativamente menor al control sin aplicación y no se diferenció en cuanto a la mortalidad confirmada del formulado correspondiente a conidios puros de *Beauveria* sp., a pesar de que este último tuvo una concentración de conidios 19 veces mayor. Además, la combinación de *Beauveria* sp. y tierra de diatomeas fue una de las formulaciones que presentó menor tiempo letal medio por la acción de este hongo entomopatógeno y a su vez, presenta costos menores de aplicación sobre hormigueros en campo que el formulado puro (T5).

En las pruebas con hormigueros del campo, la formulación combinada del aislamiento H7 de *Beauveria* sp. y la tierra de diatomeas fue el tratamiento que provocó una mayor mortalidad de nidos y la mayor disminución en la actividad de sus bocas. Por otro lado, el bioformulado como cebo granulado produjo una menor mortalidad de nidos que no

logró diferenciarse estadísticamente del control sin aplicación, aunque se observó una disminución importante en los niveles de actividad en las bocas.

Como antecedentes de insuflado de tierra de diatomeas en nidos de HCH a campo, se encontró el trabajo de Ferreira Filho et al. (2015), quienes evaluaron este producto en dosis únicas de entre 1 a 50 g/m<sup>2</sup> de montículo al interior de nidos de *A. sexdens*. La mortalidad máxima que alcanzaron fue del 31,57 %, y los autores se refieren como baja en comparación con el control químico con cebos a base de sulfluramida que utilizaron como testigo. También Silva et al. (2023) encontraron una mortalidad de solo el 25 % de nidos de *A. sexdens*, a pesar de haber insuflado en dos oportunidades 1,5 kg por nido de una mezcla de tierra de diatomeas y oxiclورو de cobre (un fungicida apto para agricultura orgánica) en una proporción de 25 gramos de tierra de diatomeas por cada gramo de oxiclورو de cobre. Consideramos que la mortalidad encontrada por estos autores es un resultado prometedor ya que la tierra de diatomeas se puede combinar con agentes de control biológico como *Beauveria* sp. y mejorar los porcentajes de hormigueros controlados, de acuerdo a los resultados de nuestro estudio.

Los resultados de Ferreira Filho et al. (2015), indican que es probable que la acción abrasiva de la tierra de diatomeas por sí sola no produzca en campo una mortalidad de obreras que sea suficiente para romper la homeostasis de las muy pobladas colonias de estos insectos sociales y que termine desencadenando su muerte. Además, la mayor eficacia de la tierra de diatomeas ocurre en condiciones de baja humedad (Korunic, 1998, Ferizli et al., 2005), mientras que los nidos subterráneos de las HCH son ambientes de elevada humedad. Es aquí donde su combinación con hongos entomopatógenos genera una ventaja, ya que el hongo sería favorecido por la elevada humedad del interior del hormiguero que necesita para penetrar al hospedero y por las abrasiones cuticulares producidas por la tierra de diatomeas.

Este es el primer trabajo que evalúa la eficacia de hongos entomopatógenos para el control de nidos de HCH del campo con una formulación en polvo, la mayoría de los estudios previos utilizaron formulaciones de cebo granulado (Lopez y Orduz, 2003; Fuster et al., 2021; Mota Filho et al., 2021; Folgarait y Goffré, 2021; Teodoro et al., 2023), mientras que una minoría utilizó formulaciones líquidas (Mota Filho et al., 2021; Cotazo-Calambas et al., 2022). En ambas modalidades los niveles de control han sido

heterogéneos, siendo más favorables los resultados en los ensayos en condiciones controladas de laboratorio.

La heterogeneidad de los resultados encontrados en la bibliografía puede atribuirse a distintas causas. Por un lado, puede deberse a características biológicas, como la actividad del aislamiento sobre la especie de hormiga que se está evaluando. Tal como se demostró en el capítulo 5, no todos los aislamientos tienen igual actividad a pesar de haber sido obtenidos de la misma especie de hormiga. Por otro lado, también podría ser determinante la presión de inóculos que se produce del agente biocontrolador sobre la colonia de HCH. De hecho, una mayor presión de inóculos tendría mayor probabilidad de alcanzar niveles epizooticos capaces de romper la homeostasis de la colonia, produciendo una muerte indirecta de la colonia (Jaccoud et al., 1999). Además, una alta presión de inóculos podría permitir que este alcance e infecte a la reina, y produzca una muerte directa de las colonias monogínicas de estas hormigas. Una analogía es el éxito de una invasión biológica por presión de propágulo (Simberloff, 2009). En este sentido, en nuestro estudio, los refuerzos en la tercera y séptima semana fueron determinantes para lograr los porcentajes de control observados en ambas formulaciones de los bioformulados, probablemente por el aumento en la presión de inóculos ejercida en momentos donde *Beauveria* sp. ya circulaba a niveles epizooticos en las colonias según lo que se observa en la Figura 34.

La actividad del aislamiento del hongo ante la plaga a controlar, o la presión de inóculos utilizada no son los únicos determinantes para el éxito del control biológico en el campo. La forma de aplicación debe adaptarse a la biología de la plaga y del biocontrolador, así como a las características operativas para facilitar su aplicación en el campo. En el caso de los hongos entomopatógenos, la principal ruta de infección al hospedero es por la cutícula, y la infección oral o digestiva es poco común (Mannino et al., 2019; Alves, 1998). Esto podría explicar por qué la formulación en polvo resultó en una mayor mortalidad en comparación con la formulación en cebo encontrada en este estudio, a pesar de que en ambos casos se utilizó la misma presión de inóculos. La formulación en cebo granulado es efectiva para introducir microorganismos o sustancias que actúen principalmente por vía oral, ya que las hormigas lamen el cebo para humedecerlo e incorporarlo al hongo simbionte (Catalani et al., 2020). Entonces, al incorporar hongos entomopatógenos en la forma de cebos granulados, el potencial infectivo disminuye considerablemente, ya que la exposición se restringe prácticamente

solo a aquellas obreras que entren en contacto directo con el bioformulado, disminuyendo la infección horizontal por contacto entre las obreras, y vertical por contacto entre obreras y la cría o la reina. En cambio, la formulación en polvo, además de adherir los conidios a la cutícula de las hormigas, impregna a muchas hormigas a la vez, junto con las estructuras internas del hormiguero, favoreciendo tanto la transmisión horizontal como vertical por contacto entre individuos impregnados de conidios con individuos limpios.

Los hallazgos presentados en este capítulo son un aporte significativo al desarrollo de estrategias de control biológico para las principales plagas de los cultivos forestales del neotrópico, específicamente las HCH, para las cuales no se han encontrado alternativas viables al control químico hasta la fecha. Los resultados encontrados muestran que la forma de introducir los hongos entomopatógenos en el interior de los nidos es un factor determinante en la mortalidad lograda. Por lo tanto, se sugiere que se realicen más estudios para encontrar una forma de aplicación de estos biocontroladores que sea capaz de romper las barreras comportamentales de defensa de las colonias de HCH y logre niveles de mortalidad competitivos con las formulaciones químicas. En este sentido, las formulaciones en polvo muestran un gran potencial.

## 7. CONCLUSIONES GENERALES

Este estudio permitió conocer la composición de especies y la abundancia de las comunidades de HCH de Misiones que se establecen en las plantaciones forestales de *P. taeda* y *E. grandis*, y en los parches de bosque nativo aledaños. Las especies de HCH que se encontraron en estos ambientes fueron primordialmente *A. sexdens* y *Ac. subterraneus*, mientras que *Ac. heyeri* es considerada como una especie rara porque fue encontrado un solo nido en uno de los sitios muestreados de *E. grandis*.

De las dos especies de HCH halladas en el bosque nativo, solo *A. sexdens* prospera en ambientes cultivados, aumentando considerablemente su abundancia en número y superficie cubierta. A pesar de que no se controlan las HCH en el bosque nativo aledaño, fue allí donde se encontraron menos nidos de la especie reconocida como una importante plaga, *A. sexdens*, contradiciendo la idea común de que los bosques son los principales refugios de nidos que actúan como importantes fuentes de reinas capaces de colonizar las plantaciones vecinas durante la temporada de reproducción. Al menos no serían fuente de reinas más importantes que las propias plantaciones forestales, en las cuales se resguardan la mayor cantidad de nidos, que además tienen un mayor tamaño, consecuentemente, más vigorosos y capaces de producir mayor cantidad de nuevas reinas.

Dos atributos de los ambientes evaluados explican las principales diferencias entre las comunidades de HCH. El primero de ellos es el tipo de uso del suelo (áreas de cultivo o bosque nativo), y el segundo es la edad de las áreas de cultivo (juvenil o adulto). En las plantaciones juveniles y adultas de *P. taeda* y *E. grandis* se encontró una marcada dominancia de *A. sexdens*, tanto en número de nidos como en superficie cubierta, en comparación con el bosque nativo aledaño donde el número de nidos de *Ac. subterraneus* fue superior al de *A. sexdens*, pero ambas especies de HCH cubren superficies similares en este ambiente. Con respecto a la edad de los cultivos, las plantaciones juveniles de ambas especies forestales presentaron comunidades de HCH similares entre sí, caracterizadas por la presencia de gran cantidad de nidos pequeños de *A. sexdens* y una escasa presencia de otras especies de HCH, mientras que en las plantaciones adultas el número de nidos es menor y son de mayor tamaño. La mayor cobertura del suelo que caracteriza al bosque nativo aledaño y a las plantaciones forestales adultas en comparación con las plantaciones juveniles, parece estar actuando

como un mecanismo *bottom-up* de regulación de la dinámica de las comunidades de HCH, ya que las HCH prefieren anidar en áreas con poca vegetación (Urbas, 2005).

La dieta de las HCH difiere entre las plantaciones forestales y la interfase con el bosque nativo. Si bien en todos los casos predominó el consumo de material forestal fresco – que es el tipo de material asociado a daños sobre las plantaciones– en los nidos de las plantaciones forestales esta categoría representó entre el 68 % y el 78%, y en los de la interfase con el bosque nativo esta representación disminuyó y se ubicó entre el 39 % y el 45 %. La dieta de las HCH no mostró una estacionalidad clara, pero el consumo de algunas categorías varió en diferentes estaciones y ambientes.

La evidencia de reducción en el consumo de plantas cultivadas en la interfase de las plantaciones con el bosque nativo, que son ambientes de mayor diversidad vegetal, destaca la necesidad de repensar el modo en que se realizan actualmente las plantaciones forestales. La inclusión de diversidad vegetal a nivel de rodal y paisaje podría mitigar los daños por HCH a las plantaciones. Sin embargo, es esencial analizar si el aumento de nidos de HCH en las interfases conlleva a daños a las plantaciones que contrarresten los beneficios de reducir el forrajeo de los nidos individuales.

La defoliación simulada afectó negativamente el crecimiento y la mortalidad de las plantas juveniles de *P. taeda* y *E. grandis*. En *P. taeda*, el tratamiento de defoliación total con el corte del meristema apical (el más intenso) redujo el diámetro a la altura del cuello en un 48%, la altura total en un 46%, y el índice de volumen en un 82%. En *E. grandis*, este mismo tratamiento de defoliación llevó a una reducción del 29% en diámetro a la altura del cuello, 24% en altura total, 63% en el índice de volumen y una mortalidad del 60%. Comparado con *P. taeda*, *E. grandis* mostró una mayor resistencia a la defoliación y mayor capacidad de rebrote cuando la defoliación es severa. A pesar de que las defoliaciones ocurrieron en una única oportunidad, los efectos repercutieron negativamente y de manera significativa sobre el crecimiento incluso 20 meses después en *P. taeda* y 16 meses en *E. grandis*, observándose además una tendencia de aumento de las diferencias en el crecimiento entre las defoliaciones más intensas y las menos intensas.

Si analizamos la defoliación real causada por las HCH, encontramos que, con 30 días de exposición, un solo nido de *A. sexdens* es capaz de producir defoliación total en el 43 % de todas las plantas que hay en una hectárea de cultivo reciente de *P. taeda*, o del 40 %

en el caso de *E. grandis*. Se destaca que la defoliación total es el tipo de daño más prevalente en ambas especies forestales. Esto indica que una vez que las hormigas seleccionan una plántula para el ataque, continúan su defoliación hasta que la misma ya no tenga hojas. La posible razón detrás de esto es que no existan diferencias en la palatabilidad de las hojas basales y apicales en plantas jóvenes, lo que lleva a una explotación completa de todas las hojas de la planta por parte de las hormigas.

En cuanto a la dinámica de ataque, se observó que en *E. grandis*, la mayoría de los ataques ocurrieron en los primeros 15 días después de la plantación, mientras que en *P. taeda*, el ataque fue más gradual durante el período de evaluación de 30 días. A pesar de estas diferencias, ambas especies forestales terminaron con proporciones similares de plantas totalmente atacadas, y sin ataque al final del período de evaluación.

La metodología de parcelas circulares, con un nido focal de *A. sexdens*, resultó ser una forma efectiva para la evaluación de los daños reales de estas HCH en monocultivos densos. Los resultados indican que la distancia de las plantas al centro del nido de *A. sexdens* está linealmente correlacionada con la probabilidad de defoliación total. Esto permitió integrar los resultados del experimento de defoliación simulada con el de defoliación real para calcular los NDE para tres escenarios de costo de control y para las dos especies forestales. Se determinó que el NDE de *A. sexdens* en plantaciones nuevas de *P. taeda* se encuentra en el rango de 1,03 a 1,3 nidos/ha, mientras que en plantaciones de *E. grandis* varía de 0,84 a 1,62 nidos/ha. Es importante destacar que la estimación del NDE para HCH es una cuestión poco explorada, y pocos trabajos han abordado este aspecto.

Además de los valores de NDE encontrados en este trabajo, el nivel económico de defoliación (Tabla 7) ofrece a los silvicultores una herramienta valiosa para la toma de decisiones en relación al manejo de las HCH. Estos porcentajes indican la cantidad de defoliación que se puede tolerar en las plantaciones jóvenes sin incurrir en pérdidas económicas, según distintos escenarios de costo de control. Esto implica que no es siempre esencial identificar la cantidad de nidos de HCH y las especies involucradas que causan esa defoliación. En situaciones donde la localización de los nidos es difícil (por factores topográficos, cobertura del suelo y/o presencia de especies de HCH que no forman montículo), los monitoreos podrían centrarse en medir los niveles de defoliación de las plantaciones. Esto permitiría a los silvicultores tomar decisiones

fundadas sobre la necesidad de llevar a cabo intervenciones de control en función de los niveles de daño observados y reducir costos en la búsqueda de hormigueros cuando estos no se pueden encontrar fácilmente.

En conjunto, los hallazgos de los ensayos de defoliación simulada y de defoliación real en parcelas circulares, resaltan la importancia de realizar gestiones tempranas y efectivas de las HCH. Por el impacto que pueden tener densidades de nidos superiores al NDE, los monitoreos y consecuentes controles de HCH deberían realizarse antes y durante el establecimiento del cultivo. Además, en el caso de *P. taeda*, se determinó que las plantaciones adultas también pueden sufrir considerables pérdidas de madera comercial si se encuentran afectadas por *A. sexdens*. Esto indica que, en los casos donde las densidades de nidos de *A. sexdens* son iguales o superiores a los encontrados en este estudio (7,36 nidos por hectárea), los silvicultores deberían considerar realizar acciones de control, más allá de los típicos realizados hasta el tercer año de la plantación.

El control biológico utilizando aislamientos locales de hongos del género *Beauveria* se mostró como una estrategia prometedora. Se encontraron elevados niveles de mortalidad de *A. sexdens* con la mayoría de los 11 aislamientos locales, sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los aislamientos en términos de supervivencia, tiempo letal medio, mortalidad confirmada y viabilidad de los conidios. La producción de conidios también varió entre los aislamientos, esto influyó en la selección del aislamiento utilizado para las pruebas de campo, específicamente, el aislamiento seleccionado fue el H7.

En las pruebas de campo, el bioformulado proveniente de un aislamiento de *Beauveria* sp. (el aislamiento H7) como polvo seco fue la alternativa más efectiva para el control de nidos de *A. sexdens*. Este es el primer trabajo donde se evalúa la efectividad de bioformulados de hongos entomopatógenos como polvo seco para el control de nidos de HCH. Los resultados obtenidos indican que se trata de una modalidad más efectiva en comparación con el bioformulado en la forma de cebo. La mejor efectividad del polvo seco puede ser explicada a través de tres razones principales que en conjunto hacen que con este formulado se logren niveles epizoóticos en las colonias de HCH.

En primer lugar, la entrada natural de los hongos entomopatógenos se da a través de la adhesión y penetración en la cutícula de los insectos. En este sentido, el bioformulado en polvo se ajusta perfectamente a este mecanismo, ya que impregna la cutícula de las

hormigas con conidios. En cambio, las formulaciones como cebo son más efectivas en combinación con agentes que se ingieren, aunque esta vía no es primordial para los hongos entomopatógenos.

En segundo lugar, el insuflado del bioformulado en polvo seco posibilita el contacto entre los conidios de *Beauveria* sp. y un mayor número de hormigas, las paredes internas del hormiguero y el hongo simbionte. Esta disposición favorece tanto la transmisión vertical como horizontal de los conidios entre los miembros de la colonia, a diferencia del cebo, donde la adhesión de los conidios se limita a las hormigas que transportan e incorporan las partículas de cebo al hongo simbionte, restringiendo en gran medida la transmisión entre miembros de la colonia.

Por último, la combinación con la tierra de diatomeas mejoró el rendimiento del polvo al aumentar el volumen de la mezcla, logrando una mayor cobertura en el interior del nido. Además, la abrasión inducida por la tierra de diatomeas sobre la cutícula de las hormigas, y la rotura de la película de bacterias con propiedades micocidas que crece sobre ella, podría favorecer la penetración de los hongos entomopatógenos.

Esta tesis aporta conocimientos y herramientas que son de importancia para el desarrollo de estrategias de manejo integrado de las hormigas cortadoras de hojas en las plantaciones forestales (y otros cultivos) en la provincia de Misiones. Se resalta a *A. sexdens* como la principal especie plaga en esta región de estudio, y se observa que el bosque nativo aledaño tiene una comunidad de HCH diferente y menos abundante que las plantaciones forestales. Se establecen los niveles de daño económico de *A. sexdens* para plantaciones juveniles de *P. taeda* y de *E. grandis*, según su respectivo escenario de costos de control. El control biológico usando hongos entomopatógenos del género *Beauveria* tiene el potencial de ser efectivo para el control de las HCH. En particular encontramos que el bioformulado como polvo seco fue el más efectivo. A partir de los experimentos realizados en esta tesis, encontramos que más allá de un problema biológico de tener aislamientos de *Beauveria* spp. que sean lo suficientemente activos sobre las especies de HCH que se desean controlar; también nos enfrentamos a un problema tecnológico. Futuras investigaciones deberían centrarse en estudiar otras formulaciones de aplicación de los bioformulados que se adapten mejor a los mecanismos de acción que tienen estos hongos entomopatógenos, y su interacción con estos insectos que presentan comportamientos sociales tan sofisticados.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alípio, A. S. (1989). Controle de formigas cortadeiras. *Normas Técnicas da Pains Florestal* 8pp.
- Alves, L. F. A., de Oliveira, D. G. P., Pares, R. B., Sparagano, O. A. E. y Godinho, R. P. (2020). Association of mechanical cleaning and a liquid preparation of diatomaceous earth in the management of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Mesostigmata: Dermanyssidae). *Experimental & Applied Acarology*, 81(2), 215–222.  
<https://doi.org/10.1007/s10493-020-00497-z>
- Alves, L. F., Oliveira, D. G. P., Kasburg, C. R., y Nardelli, M. S. (2019). Acaricidal activity of inert powders against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) (Mesostigmata: Dermanyssidae). *Archives of Veterinary Science*, 24(2).  
<https://doi.org/10.5380/avs.v24i2.62775>
- Alves, S. B. (1998). *Controle Microbiano de Insetos* (2nd ed., Vol. 4). Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba.
- Alves, S. B. y Lopes, R. B. (2008). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba.
- Amaya-Hernández, L. M., Mera-Velasco, Y. A., Gallego-Roperio, M. C., Montoya-Lerma, J., y Armbrrecht, I. (2019). Herbivoría de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) en parches de bosque seco tropical del suroccidente colombiano. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 23(2), 171-189.
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Pandey, A., Singh, S., y Pillai, S. (2020). Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7), 1019-1034.
- Andrade, A. P. P. D., Forti, L. C., Moreira, A. A., Boaretto, M. A. C., Ramos, V. M. y Matos, C. A. O. D. (2002). Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. *Sociobiology*, 40(2), 293-306.
- Antmaps.org. (29 de febrero de 2024). Ants diversity view. Antmaps.org.  
<https://antmaps.org>

Arauco. (2015). Resumen público: Plan de Manejo Forestal, Área Forestal Misiones.  
<https://arauco.com/argentina/wp-content/uploads/sites/15/2017/07/Resumen-Publico-Plan-de-Manejo-Sept-2015-MISIONES.pdf>

Arauco. (2021). Resumen público: Plan de Manejo Forestal, Área Forestal Misiones.  
[https://arauco.com/argentina/wp-content/uploads/sites/15/2017/07/Plan\\_de\\_Manejo\\_Forestal\\_Argentina-1.pdf](https://arauco.com/argentina/wp-content/uploads/sites/15/2017/07/Plan_de_Manejo_Forestal_Argentina-1.pdf)

Aukema, J. E., Leung, B., Kovacs, K., Chivers, C., Britton, K. O., Englin, J., Frankel, S. J., Haight, R. G., Holmes, T. P., Liebhold, A. M., McCullough, D. G. y Von Holle, B. (2011). Economic impacts of non-native forest insects in the continental United States. *PLoS one*, 6(9), e24587. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024587>

Balzan, M.V., Bocci, G. y Moonen, A.C. (2016). Landscape complexity and field margin vegetation diversity enhance natural enemies and reduce herbivory by Lepidoptera pests on tomato crop. *BioControl*, 61, pp.141-154.

Barnola, L. F., Hasegawa, M., y Cedeño, A. (1994). Mono-and sesquiterpene variation in *Pinus caribaea* needles and its relationship to *Atta laevigata* herbivory. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22(5), 437-445.

Barrera, C. A., Buffa, L. M., y Valladares, G. (2015). Do leaf-cutting ants benefit from forest fragmentation? Insights from community and species-specific responses in a fragmented dry forest. *Insect Conservation and Diversity*, 8(5), 456-463.

Barzman, M., Bàrberi, P., Birch, A. N. E., Boonekamp, P., Dachbrodt-Saaydeh, S., Graf, B., ... y Sattin, M. (2015). Eight principles of integrated pest management. *Agronomy for sustainable development*, 35, 1199-1215.

Bates, D., Mächler, M., Bolker B. y Walker, S. (2015). "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4." *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48.  
doi:10.18637/jss.v067.i01.

Bich, G. A., Castrillo, M. L., Villalba, L. L., y Zapata, P. D. (2017). Isolation of the symbiotic fungus of *Acromyrmex pubescens* and phylogeny of *Leucoagaricus gongylophorus* from leaf-cutting ants. *Saudi journal of biological sciences*, 24(4), 851-856.

- Blanton, C. M., y Ewel, J. J. (1985). Leaf-cutting ant herbivory in successional and agricultural tropical ecosystems. *Ecology*, 66(3), 861-869.
- Bollazzi, M., Forti, L. C., Moreira, S., y Roces, F. (2014). Efficiency and soil contamination during underground application of insecticides: Control of leaf-cutting ants with thermal foggers. *Journal of Pest Science*, 87(1), 181–189. DOI: 10.1007/s10340-013-0525-7
- Bolton, B. (2023). An online catalog of the ants of the world. Disponible en: <https://antcat.org>. Acceso en: 09 ag. 2023.
- Borgmeier, T. O. F. M. (1959). Revision der Gattung *Atta* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae). *Studia Entomology*, 2: 321-390.
- Bot, A. N., Currie, C. R., Hart, A. G., y Boomsma, J. J. (2001). Waste management in leaf-cutting ants. *Ethology Ecology & Evolution*, 13(3), 225-237.
- Buratto, D. A., Cardoso, J. T., Rolim, F. A. y Reis Filho, W. (2012). Avaliação dos danos causados por formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera) aos plantios de *Pinus taeda* no planalto sul-catarinense. *Floresta*, 42(4), 683–690. DOI: <https://doi.org/10.5380/rf.v42i4.23710>
- Busarello, G. (2008). Avaliação da patogenicidade de *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) Sorokin para o controle de *Atta sexdens rubropilosa* (FOREL, 1908) (Hymenoptera: Formicidae) em condições de laboratório. Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Brasil.
- Caldeira, M. A., Zanetti, R., Moraes, J. C., y Zanuncio, J. C. (2005). Distribuição espacial de saúveiros (Hymenoptera: Formicidae) em eucaliptais. *Cerne*, 11(1), 34-39.
- Cámara de Representantes de la Provincia de Misiones. (2018). Digesto Jurídico de la Provincia de Misiones. Ley XVI-Nº5. Disponible en <http://digestomisiones.gob.ar/uploads/documentos/leyes/LEY%20XVI%20-%20N%205.pdf>
- Cantarelli, E. B. (2005). Silvicultura de precisão no monitoramento e controle de formigas cortadeiras em plantios de *Pinus*. Universidade Federal de Santa Maria.

- Cantarelli, E. B., Costa, E. C., Pezzutti, R. y da Silva Oliveira, L. D. S. (2008). Quantificação das perdas no desenvolvimento de *Pinus taeda* após o ataque de formigas cortadeiras. *Ciencia Florestal*, 18(1), 39–45. DOI: <https://doi.org/10.1515/HF.2008.085>
- Cantarelli, E. B., Costa, E. C., Pezzutti, R. V., Zanetti, R. y Fleck, M. D. (2019). Damage by *Acromyrmex* spp. to an initial *Pinus taeda* L. Planting. *Floresta e Ambiente*, 26(4). DOI: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.006016>
- Cardoso, S. R.; Nagamoto, N. S.; Forti, L. C.; Souza, E. S. (2012). Carrying and effect of granulated baits formulated with entomopathogenic fungi among *Atta sexdens rubropilosa* colonies (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 59(3), 681-689.
- Catalani, G. C., Camargo, R. S., Sousa, K. K. A., Caldato, N., Silva, A. A. C., y Forti, L. C. (2020). Fat-soluble substance flow during symbiotic fungus cultivation by leaf-cutter ants. *Neotropical entomology*, 49, 116-123.
- Chen, W. H., Liu, M., Huang, Z. X., Yang, G. M., Han, Y. F., Liang, J. D., y Liang, Z. Q. (2018). *Beauveria majiangensis*, a new entomopathogenic fungus from Guizhou, China. *Phytotaxa*, 333(2), 243-250.
- Colegio de Ingenieros Forestales de Misiones. (2022). *Boletín de costos de plantación y cuidados culturales + elaboración y flete*. Noviembre de 2022. <https://www.coiform.com.ar/index.php>
- Coley, P. D., Bryant, J. P., y Chapin III, F. S. (1985). Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, 230(4728), 895-899.
- Coley, P.D. (1983) Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs*, 53, 209– 233.
- Correa-Bueno, F. (2013). Seleção de ingredientes ativos para o desenvolvimento de iscas tóxicas para o controle de formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) [Tesis de doctorado, Unesp]. Repositorio de la Uesp: <https://repositorio.unesp.br/>
- Costa, E., Avila, M., Cantarelli, E.; Murari, A. y Manzoni, C. (2008). *Entomologia Florestal*. Rio Grande do Sul: Editora UFSM.
- Cotazo-Calambas, K. M., Niño-Castro, A., Valencia-Giraldo, S. M., Gómez-Díaz, J. S., y Montoya-Lerma, J. (2022). Behavioral Response of the Leaf-Cutting Ant *Atta*

*cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) to *Trichoderma* sp. *Journal of Insect Behavior*, 35(4), 92-102.

Cristiano, M. P., Cardoso, D. C., Sandoval-Gómez, V. E., y Simões-Gomes, F. C. (2020). *Amoimymex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. *Austral Entomology*, 59(4), 643-676.

Currie, C. (2001). Community of ants, fungi and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 357–380.

da Silva, J. L., de Holanda Silva, I. L., Ribeiro-Neto, J. D., Wirth, R., y Leal, I. R. (2018). Forest edge orientation influences leaf-cutting ant abundance and plant drought stress in the Brazilian Atlantic forest. *Agricultural and forest entomology*, 20(3), 358-365.

Da Silva Camargo, R., Puccini, C., Forti, L. C. y De Matos, C. A. O. (2017). Allogrooming, self-grooming, and touching behavior: Contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye. *Insects*, 8(2), 59.

da Silva Camargo, R., Hastenreiter, I. N., Forti, L. C., y Santos Lopes, J. F. (2015). Relationship between mandible morphology and leaf preference in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(2), 241-244.

De Almeida, W. R., Wirth, R., y Leal, I. R. (2008). Edge-mediated reduction of phorid parasitism on leaf-cutting ants in a Brazilian Atlantic forest. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129(3), 251-257.

De Coll, O.; Della Lucia, T. Cuezso, F. (2007). Does *Apocephalus attophilus* Borgmeier (Diptera: Phoridae) influence the presence of hitchhikers on leaf fragments carried by *Atta sexdens* workers?. INTA, Centro Regional Misiones, E.E.A. Montecarlo. *Publicación n° 7*. ISSN 0327 – 9278.

De Coll, O. (2004). *Identificación, Bioecología y Forrajeo de Hormigas de los Géneros Atta y Acromyrmex (Hymenoptera: Formicidae) en Ambientes Agropecuarios y Forestales en Misiones, Argentina* [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad Nacional del Nordeste.

De Souza Loureiro, E., Busarello, G. D., Pessoa, L. G. A., Uchoa-Fernandes, M. A., do Amaral, T. S., y Pessoa, M. B. (2022). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) in laboratory conditions. *Research, Society and Development*, 11(2), e41011225831-e41011225831.

Della Lucia, T. M., Gandra, L. C., y Guedes, R. N. (2014). Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest management science*, 70(1), 14-23.

Della Lucia, T. M. (Ed.). (2011). *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa.

Della-Lucia, T. M. C. (2003). Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In: Fernandez F (ed) *Introducción a las hormigas de la Región Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexer von Humboldt, Bogota, pp 337-349

Dohm, C., Leal, I. R., Tabarelli, M., Meyer, S. T., y Wirth, R. (2011). Leaf-cutting ants proliferate in the Amazon: an expected response to forest edge?. *Journal of Tropical Ecology*, 27(6), 645-649.

Elizalde, L., y Folgarait, P. J. (2010). Host diversity and environmental variables as determinants of the species richness of the parasitoids of leaf-cutting ants. *Journal of Biogeography*, 37(12), 2305-2316.

Elizalde, L., y Folgarait, P. J. (2012). Behavioral strategies of phorid parasitoids and responses of their hosts, the leaf-cutting ants. *Journal of Insect Science*, 12(1), 135.

Egolf, P., Villacide, J., Benito Amaro, I. y Casellas, K. (2022). Percepción del impacto y costos asociados al manejo de hormigas cortadoras de hojas en plantaciones forestales de Misiones y Corrientes, Argentina. *Publicación especial de la Sociedad Argentina de Entomología* 4: 563. ISSN En línea 2953-4178

Faberi, A. J., Clemente, N. L., Manetti, P. L., y Lopez, A. N. (2014). Nivel de daño económico de *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) (Crustacea: Isopoda) en el cultivo de girasol. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 40(2), 182-188.

Farji-Brener, A. G. (2001). Why are leaf-cutting ants more common in early secondary forests than in oldgrowth tropical forests? An evaluation of the palatable forage hypothesis. *Oikos* 92:169-177.

- Farji-Brener, A. G. y Ruggiero, A. (1994). Leaf-Cutting Ants (*Atta* and *Acromyrmex*) Inhabiting Argentina: Patterns in Species Richness and Geographical Range Sizes. *Journal of Biogeography*, 21(4), 391. DOI: <https://doi.org/10.2307/2845757>
- Ferizli, A. G., Beris G. y Baspinar E. (2005). Mortality and F<sub>1</sub> production of *Rhyzopertha dominica* (F.) on wheat treated with diatomaceous earth: Impact of biological and environmental parameters on efficacy. *J. Pest Sci.* 78: 231–238.
- Fernández, F. (2003). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical* (Vol. 26, pp. 307-330). Bogotá: Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt.
- Fernández, R., Sosa, D., Pahr, N., Von Wallis, A., Bárbaro, S., y Albarracin, S. (2015). Provincia de Misiones. In R. Casas y G. Albarracin (Eds.), *El deterioro del suelo y del ambiente en la Argentina*, tomo II (pp. 187–200). PROSA –Centro para la promoción de la conservación del suelo y del agua.
- Fernandez-Conradi, P., Jactel, H., Hampe, A., Leiva, M. J. y Castagneyrol, B. (2017). The effect of tree genetic diversity on insect herbivory varies with insect abundance. *Ecosphere*, 8(1), e01637.
- Fernandez-Daza, F. F., Rodriguez-Roman, G., Valencia-Rodriguez, M., Gonzalez-Vargas, I. A., Cardenas-Heano, H., Pascol-Cereda, M. y Cuervo-Mulet, R. A. (2019). Spores of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma lignorum* as a bioinsecticide for the control of *Atta cephalotes*. *Biological research*, 52.
- Fernandez-Marin, H., Zimmerman, J. K., y Wcislo, W. T. (2004). Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Biological Journal of the Linnean Society*, 81(1), 39-48.
- Ferreira-Filho, P. J., Wilcken, C. F., Neves, D. A., Pogetto, M. H., Carmo, J. B., Guerreiro, J. C., ... y Zanuncio, J. C. (2015). Does diatomaceous earth control leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae) in the *Eucalyptus* plantations?. *Journal of Economic Entomology*, 108(3), 1124-1128.
- Fischbein, D. (2012). Introducción a la teoría del control biológico de plagas. *Serie Técnica: Manejo Integrado de Plagas Forestales*, 15, 1-15.

- Fisher, P. J., Stradling, D. J., y Pegler, D. N. (1994). *Leucoagaricus basidiomata* from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycological Research*, 98(8), 884-888.
- Folgarait, P. J. (1998). Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. *Biological Conservation* 7: 1221-1244
- Folgarait, P. J. (2013). Leaf-cutter ant parasitoids: current knowledge. *Psyche*, 2013.
- Folgarait, P. J., y Goffré, D. (2021). Biological control of leaf-cutter ants using pathogenic fungi: experimental laboratory and field studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(9), 813-824.
- Folgarait, P. J., Goffré, D., y Giraldo Osorio, A. (2020). *Beauveria bassiana* for the control of leafcutter ants: strain and host differences. *Biocontrol Science and Technology*, 30(9), 996-1005.
- Folgarait, P. J., Dyer, L. A., Marquis, R. J., y Braker, H. E. (1996). Leaf-cutting ant preferences for five native tropical plantation tree species growing under different light conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80(3), 521-530.
- Folgarait, P. J., Goffré, D., y Giraldo Osorio, A. (2020). *Beauveria bassiana* for the control of leafcutter ants: strain and host differences. *Biocontrol Science and Technology*, 30(9), 996-1005.
- Folgarait, P. J., Marfetan, J. A., y Cafaro, M. J. (2011). Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental Entomology*, 40(2), 342-349.
- Forest Stewardship Council. (2019). Lista de derogaciones aprobadas para el uso de ‘pesticidas altamente peligrosos’. FSC International Center. [Pdf file]. <https://fsc.org/en/docum ent-centr e/docum ents/ retrieve/21741 259-b0f8-4e09-9300-45f4eb540874>
- Fowler, H.G., L.C. Forti, V. Pereira-da-Silva y N.B. Saes. (1986). Economics of grass-cutting ants, p.18-35. In C.S. Lofgren, R.K. Vander Meer (eds.), *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*. Westview Press, Boulder.
- Freitas, S. D., y Berti Filho, E. (1994). Efeito do desfolhamento no crescimento de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (*Myrtaceae*). *IPEF*, (47), 36-43.

- Fundación Vida Silvestre Argentina. (19 de agosto de 2023). *El Bosque Atlántico*.  
Fundación Vida Silvestre Argentina. <https://atlanticforest.vidasilvestre.org.ar/>
- Fuster, A., Coronel, C., Navarro, M., y Diodato, L. (2021). Alternativas para el control de *Acromyrmex striatus* Roger en una plantación de *Prosopis alba* Griseb en el departamento Capital de Santiago del Estero, Argentina. *Quebracho (Santiago del Estero)*, 29(1), 15-24.
- Gandra, L. C., Amaral, K. D., Couceiro, J. C., Della Lucia, T. M. y Guedes, R. N. (2016). Mechanism of leaf-cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. *Pest Management Science*, 72(8), 1475–1481. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4239>
- Giesel, A., Boff, M. I. C., y Boff, P. (2013). Seasonal activity and foraging preferences of the leaf-cutting ant *Atta sexdens piriiventris* (Santschi) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical entomology*, 42, 552-557.
- Gonçalves, C. R. (1961). O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). *Studia entomológica*, 4(1-4), 113-180.
- Hermann, H. (Ed.). (2012). *Social Insects V4* (Vol. 4). Elsevier.
- Hernández, J. V. y Jaffé, K. (1995). Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor. e elementos para o manejo da praga. *Anais Da Sociedade Entomológica Do Brasil*, 24(2), 287–298. DOI: <https://doi.org/10.37486/0301-8059.v24i2.1029>
- Herrera, E. E., Sánchez, V., y Blanco, H. (2013). Formulación de gránulos bases para la incorporación De ingredientes activos con efecto biológico sobre el hongo simbiótico cultivado por las hormigas forrajeras del género *Atta*. *Agronomía Costarricense*, 37(2), 55-69.
- Higley, L. G., y Pedigo, L. P. (Eds.). (1996). *Economic thresholds for integrated pest management* (Vol. 9). U of Nebraska Press.
- Hothorn, T., Bretz, F. y Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* 50(3), 346--363.
- Hölldobler, B. and E. O. Wilson. (1990). *The ants*. Cambridge Univ. Press. N.Y.

Iezzi, M. E., Di Bitetti, M. S., Pardo, J. M., Paviolo, A., Cruz, P., y De Angelo, C. (2022). Forest fragments prioritization based on their connectivity contribution for multiple Atlantic Forest mammals. *Biological Conservation*, 266, 109433.

Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P. M., El Meziane, A., y Yao, Y. J. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(4), 1204-1212.

Instituto Forestal Provincial. (29 de febrero de 2024). Valores de la materia prima forestal acordados por el Directorio para la provincia de Misiones.

<https://infopro.misiones.gob.ar/index.php/category/precios-materia-prima/>

Instituto Geográfico Nacional de la República Argentina. (2022). Información Geoespacial de Argentina. Retrieved from

<https://www.ign.gob.ar/NuestrasActividades/InformacionGeoespacial/CapasSIG>

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2021). Censo Nacional Agropecuario 2018: resultados definitivos / 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Instituto Provincial de Estadísticas y Censos. (2015). Gran Atlas de Misiones 1ª ed. – Posadas, Misiones.

Jaccoud, D. B., Hughes, W. O. H., y Jackson, C. W. (1999). The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 93(1), 51-61.

Jiménez, N.L., Fosco, I.R., Nassar, G.C., Sánchez-Restrepo, A.F., Danna, M.S. and Calcaterra, L.A. (2021), Economic Injury Level and Economic Threshold as required by Forest Stewardship Council for management of leaf-cutting ants in forest plantations. *Agr Forest Entomol*, 23: 87-96. <https://doi.org/10.1111/afe.12409>

Jiménez, N. L., Farji-Brener, A. G., y Calcaterra, L. A. (2022). Long-term quantification of leaf-cutting ant damage in willow forestations in the lower delta of the Paraná River, Argentina. *Agricultural and Forest Entomology*, 24(3), 432-445.

Jung, P. H., Silveira, A. C. D., Nieri, E. M., Potrich, M., Silva, E. R. L. D., y Refatti, M. (2013). Atividade Inseticida de *Eugenia uniflora* L. e *Melia azedarach* L. sobre *Atta laevigata* Smith. *Floresta e Ambiente*, 20, 191-196.

- Justo, E. E. (1979). *Economía de la empresa forestal*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Madrid.
- Kassambara, A., Kosinski, M., Biecek, P., y Fabian, S. (2021). *Survminer: Drawing Survival Curves Using Ggplot2*. 2021. URL <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>. R package version 0.4,9.
- Khonsanit, A., Luangsa-ard, J. J., Thanakitpipattana, D., Noisripoom, W., Chaitika, T. y Kobmoo, N. (2020). Cryptic diversity of the genus *Beauveria* with a new species from Thailand. *Mycological progress*, 19, 291-315.
- Köppen, W. (1948). Las zonas del clima. In: *Climatología*. México: Fondo de Cultura Económica, 63 p.
- Korunic, Z. (1998). Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. *J. Stored Prod. Res.* 34: 87–97.
- Kost, C., de Oliveira, E. G., Knoch, T. A. y Wirth, R. (2005). Spatio-temporal permanence and plasticity of foraging trails in young and mature leaf-cutting ant colonies (*Atta* spp.). *Journal of Tropical Ecology*, 21(6), 677–688. DOI: 10.1017/S0266467405002592
- Lange, L., y Grell, M. N. (2014). The prominent role of fungi and fungal enzymes in the ant–fungus biomass conversion symbiosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 4839-4851.
- Lenth, R. (2022). *\_emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means\_*. R package version 1.8.3. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Lewis, T. y Norton, G. A. (1973). Aerial baiting to control leaf-cutting ants (Formicidae, Attini) in Trinidad. Economic implications. *Bulletin of Entomological Research*, 63(2), 289–303. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007485300039079>
- Liebhold, A. M., Brockerhoff, E. G., Kalisz, S., Nuñez, M. A., Wardle, D. A. y Wingfield, M. J. (2017). Biological invasions in forest ecosystems. *Biological Invasions* 19, no. 11: 3437-3458.
- Lopez, E., y Orduz, S. (2003). *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control*, 27(2), 194-200.

- López-Riquelme, G. O., y Ramón, F. (2010). El mundo feliz de las hormigas. Tip *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 13(1), 35-48.
- Loureiro, E. D. S., y Monteiro, A. C. (2005). Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Árvore*, 29, 553-561.
- Loureiro, E. D. S., y Monteiro, A. C. (2004). Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, 71(1), 35-40.
- Lovett, B., y St. Leger, R. J. (2017). The insect pathogens. *Microbiology Spectrum*, 5(2), 10-1128.
- Mannino, M. C., Huarte-Bonnet, C., Davyt-Colo, B., y Pedrini, N. (2019). Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. *Journal of Fungi*, 5(2), 33.
- Marinho, C. G. S. et al. (2011). Voo Nupcial ou Revoada de Formigas-Cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). *Formigas-Cortadeiras da Biologia ao Manejo*. Viçosa - MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. p. 165–172.
- Matrangolo, C. A. R., Castro, R. V. O., Lucia, T. M. C. D., Lucia, R. M. D., Mendes, A. F. N., Costa, J. M. F. N., y Leite, H. G. (2010). Crescimento de eucalipto sob efeito de desfolhamento artificial. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45, 952-957.
- Mattoso, T. C., Moreira, D. D., y Samuels, R. I. (2012). Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biology Letters*, 8(3), 461-464.
- Maurer, P., Couteaudier, Y., Girard, P. A., Bridge, P. D., y Riba, G. (1997). Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycological Research*, 101(2), 159-164.
- Meyer, S. T., Leal, I. R., y Wirth, R. (2009). Persisting hyper-abundance of leaf-cutting ants (*Atta* spp.) at the edge of an old Atlantic forest fragment. *Biotropica*, 41(6), 711-716.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2015). Argentina: Plantaciones forestales y gestión sostenible. [Pdf file]. Retrieved from [http://forestindustria.magyp.gob.ar/archivos/gestion-forestal-sostenible/publi\\_ambiental.pdf](http://forestindustria.magyp.gob.ar/archivos/gestion-forestal-sostenible/publi_ambiental.pdf).

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación. (2022). Segundo Inventario Nacional de Bosques Nativos: Informe Nacional. Buenos Aires: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación.

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación. (2017). *Actualización del Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPS) en la República Argentina* / coordinación general de Leila Devia; dirigido por Leila Devia. - 1a ed. - San Martín: Instituto Nacional de Tecnología Industrial - INTI, 2018. Libro digital, PDF

Ministerio del Agro y la Producción. (2022). Rodales forestales de Misiones. [Mapa Interactivo]. Retrieved from [http://ide.ordenamientoterritorial.misiones.gob.ar/index.php?option=com\\_content&view=article&id=8&Itemid=3](http://ide.ordenamientoterritorial.misiones.gob.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=8&Itemid=3)

Miyashira, C. H., Tanigushi, D. G., Gugliotta, A. M., y Santos, D. Y. A. C. D. (2010). Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* forel in two culture media. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 506-511.

Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A. y Calle, Z. (2012). Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *International Journal of Pest Management*, 58(3), 225–247. DOI: <https://doi.org/10.1080/09670874.2012.663946>

Mora, M. A. E., Castilho, A. M. C., y Fraga, M. E. (2018). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84.

Mota Filho, T. M. M., Stefanelli, L. E. P., Camargo, R. D. S., Matos, C. A. O. D., y Forti, L. C. (2021). Biological control in leaf-cutting ants, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), using pathogenic fungi. *Revista Árvore*, 45.

Moutinho, P., Nepstad, D. C., y Davidson, E. A. (2003). Influence of leaf-cutting ant nests on secondary forest growth and soil properties in Amazonia. *Ecology*, 84(5), 1265-1276.

- Nichols-Orians, C. M. (1991). Environmentally induced differences in plant traits: consequences for susceptibility to a leaf-cutter ant. *Ecology*, 72(5), 1609-1623.
- Nickele, M. A., Reis Filho, W., Penteadó, S. R. C., de Queiroz, E. C., Schaitza, E. G. y Pie, M. R. (2020). Potential damage by *Acromyrmex* ant species in pine plantations in southern Brazil. *Agricultural and Forest Entomology*, 23(1), 32–40. DOI: <https://doi.org/10.1111/afe.12400>
- Nickele, M. A., Reis Filho, W., Oliveira, E. B. D., Iede, E. T., Caldato, N., y Strapasson, P. (2012). Leaf-cutting ant attack in initial pine plantations and growth of defoliated plants. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47, 892-899.
- Nickele, M. A. (2008). Distribuição espacial, danos e planos de amostragem de *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) em plantios de *Pinus taeda* L. (*Pinaceae*). Universidade Federal do Paraná.
- Nickele, M. A., Reis Filho, W., Iede, E. T., Caldato, N., Bridi, G. y Ferreira, A. C. (2007). Densidade de formigueiros e danos causados por *Acromyrmex crassispinus* (Hymenoptera: formicidae) em plantio inicial de *Pinus taeda*. *O Biológico*, 69(2), 542pp.
- Núñez, M. y Olmedo, R. D. (2013). Definición de aspectos relevantes para el correcto manejo de hormigas cortadoras en el Litoral Argentino. *XXVII Jornadas Forestales de Entre Ríos*, 1–8.
- Núñez, M., Pezzutti, R. y Cantarelli, E. B. (2020). Determinación del daño causado por hormigas cortadoras en la implantación de *Pinus taeda*. *XXXIV Jornadas Forestales de Entre Ríos*, 53–57.
- Oi, D. H., y Pereira, R. M. (1993). Ant behavior and microbial pathogens (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist*, 63-74.
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, S. et al. (2022). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6–4.
- Pedigo, L. P. (1996). *Entomology and pest management* (No. Ed. 2). Prentice-Hall Inc.

- Pérez, S. P., Corley, J. C., y Farji-Brener, A. G. (2011). Potential impact of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* on conifer plantations in northern Patagonia, Argentina. *Agricultural and Forest Entomology*, 13(2), 191-196.
- Perri, D. V., Gorosito, N. B., Schilman, P. E., Casaubón, E. A., Dávila, C., y Fernández, P. C. (2021). Push-pull to manage leaf-cutting ants: an effective strategy in forestry plantations. *Pest management science*, 77(1), 432-439.
- Phillips, F., Etheridge, P., y Scott, G. (1976). Formulation and field evaluation of experimental baits for the control of leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae) in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 66(4), 579-585.  
doi:10.1017/S0007485300010683
- Pilati, A., Quirán, E. M., y Estelrich, H. D. (1997). Actividad forrajera de *Acromyrmex lobicornis* Emery (Hymenoptera: Formicidae) en un pastizal natural semiárido de la provincia de La Pampa (Argentina). *Ecología Austral*, 7(02), 049-056.
- Pimentel, F. A., Bailez, O., Pereira, R. C., y Viana-Bailez, A. M. (2022). Phorid parasitoids of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* in the Atlantic Forest: occurrence, parasitism rate, and host size. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 170(6), 495-504.
- Pinheiro J, Bates D, R Core Team. (2022). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-161, <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- R (Nº de versión 4.2.2). (2022). x86\_64-w64-mingw32/X64 (64-Bit). ucrt: The R Foundation for Statistical Computing Platform.
- Ramos, V. M., Forti, L. C., Andrade, A. P. P., Noronha, N. C., y Silva Camargo, R. D. (2008). Density and spatial distribution of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata* colonies (Hym., Formicidae) in *Eucalyptus* spp. forests. *Sociobiology*, 51(3), 775-782.
- Reis Filho, W., dos Santos, F., Strapasson, P. y Nickele, M. A. (2011). Danos causados por diferentes níveis de desfolha artificial para simulação do ataque de formigas cortadeiras em *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 31(65), 37-42. DOI: <https://doi.org/10.4336/2011.pfb.31.65.37>

- Sabattini, J. A. (2017). Impacto de hormigas cortadoras de hojas en ecosistemas implantados de Sudamérica. Trabajo final integrador. Especialización en manejo de recursos forestales. Universidad Nacional del Nordeste.
- Sabattini, J. A. (2019). Ingeniería ecosistémica de *Atta vollenweideri* (Forel, 1893): efectos sobre la vegetación herbácea de un gradiente espacial en un bosque nativo. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Entre Ríos.
- Sánchez-Restrepo, A. F., Jiménez, N. L., Confalonieri, V. A., y Calcaterra, L. A. (2019). Distribution and diversity of leaf-cutting ants in Northeastern Argentina: species most associated with forest plantations. *International Journal of Pest Management*, 65(3), 244-257.
- Santana, D. D. Q., y Couto, L. (1990). Resistência intra-específica de eucaliptos a formigas-cortadeiras. *Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo*, n. 20, p.13-21
- Santos, A. V., Dillon, R. J., Dillon, V. M., Reynolds, S. E., y Samuels, R. I. (2004). Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS microbiology letters*, 239(2), 319-323.
- Scherf, A. N., Corley, J. C., Gioia, C. D., Eskiviski, E. R., Carazzo, C., Patzer, H. R., y Dimarco, R. D. (2022a). Impact of a leaf-cutting ant (*Atta sexdens* L.) on a *Pinus taeda* plantation: A 6 year-long study. *Journal of Applied Entomology*, 146(9), 1178-1184.
- Scherf, A. N., Barth, S. R., Eskiviski, E. R. (2022b). Hormigas cortadoras de hojas: Métodos de control. *EEA Montecarlo INTA*. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/12508>
- Silva, M. D., y Diehl-Fleig, E. (1988). Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) (Hymenoptera: Formicidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 17(2), 263-269.
- Silva, A., Rodrigues, A., Bacci, M., Pagnocca, F. C., y Bueno, O. D. C. (2006). Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. *Mycopathologia*, 162, 115-119.
- Simberloff, D. (2009). The role of propagule pressure in biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 81-102.

- Slutzky, D. (2016). La forestoindustria en Misiones y Corrientes: impactos sociales, económicos y territoriales. Instituto Argentino para el Desarrollo Económico (IADE). [Pdf file]. Retrieved from [https://www.ciea.com.ar/web/wp-content/uploads/2016/11/Doc9\\_6.pdf](https://www.ciea.com.ar/web/wp-content/uploads/2016/11/Doc9_6.pdf)
- Smith RF, Reynolds HT. (1965). Principles, definitions and scope of integrated pest control. En *Proceedings of the FAO symposium on integrated pest control 1*:11-7.
- Souza, A., Zanetti, R., y Calegario, N. (2011). Nivel de dano econômico para formigas-cortadeiras em função do índice de produtividade florestal de eucaliptais em uma região de Mata Atlântica. *Neotropical Entomology*, 40, 483-488.
- Stefanelli, L. E. P., Mota Filho, T. M. M., Camargo, R. D. S., Matos, C. A. O. D., y Forti, L. C. (2020). Effects of entomopathogenic fungi on individuals as well as groups of workers and immatures of *Atta sexdens rubropilosa* leaf-cutting ants. *Insects*, 12(1), 10.
- Stern, V., Smith, R., van den Bosch, R. y Hagen, K. (1959). The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: The integrated control concept. *Hilgardia* 29(2):81-101. DOI:10.3733/hilg.v29n02p081
- Swanson, A. C., Schwendenmann, L., Allen, M. F., et al. (2019). Welcome to the Atta world: A framework for understanding the effects of leaf-cutter ants on ecosystem functions. *Funct Ecol.* 33: 1386– 1399. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13319>
- Tanksley, S. D. y McCouch, S. R. (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277(5329), 1063-1066.
- Tarragó, J., Pinto Ruíz, G., Fediuk, A. (2017). Artrópodos plaga: conociendo los comensales indeseados del yerbal en Pablo Leandro Capellari (Ed.), *Yerba mate, reseña histórica y estadística, producción e industrialización en el siglo XXI* (1a ed., pp.215-230). Consejo Federal de Inversiones.
- Teodoro, T. B. P., Carolino, A. T., Queiroz, R. R. D. S., Oliveira, P. B. D., Moreira, D. D. O., Silva, G. A., y Samuels, R. I. (2023). Production of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) Mycelial Pellets and Their Effects on Leaf-Cutting Ant Fungal Gardens. *Pathogens*, 12(2), 330.

- Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J., Kannangara, S. D., y Promptutha, I. (2020). Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 604923.
- Therneau, T. (2023). *A Package for Survival Analysis in R*. R package version 3.5-0, <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.
- Tonhasca Jr, A., Bragança, M. A. L., y Erthal Jr, M. (2001). Parasitism and biology of *Myrmosicarius grandicornis* (Diptera, Phoridae) in relationship to its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, 48, 154-158.
- United Nations Environment Programme. Ozone Secretariat. (2012). *Annual Report 2012*. UNON/Publishing Section Services/Nairobi, ISO 14001:2004-certified
- Urbas, P. (2005). *Effects of forest fragmentation on bottom-up control in leaf-cuttings ants* [Tesis de doctorado, Technische Universität Kaiserslautern]. <https://kluedo.ub.rptu.de/frontdoor/index/index/docId/1595>
- Urbas, P., Araújo Jr, M. V., Leal, I. R., y Wirth, R. (2007). Cutting more from cut forests: edge effects on foraging and herbivory of leaf-cutting ants in Brazil. *Biotropica*, 39(4), 489-495.
- Valencia-Giraldo, S. M. (2014). Efecto de microorganismos entomopatógenos y antagonicos como potenciales agentes de control biológico de hormiga arriera *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) (Tesis de maestría, Universidad del Valle, available at: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/handle/10893/8080>).
- Varón, E. H., Eigenbrode, S. D., Bosque-Pérez, N. A., y Hilje, L. (2007). Effect of farm diversity on harvesting of coffee leaves by the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Agricultural and Forest Entomology*, 9(1), 47-55.
- Vasconcelos, H. L. (1997). Foraging activity of an Amazonian leaf-cutting ant: Responses to changes in the availability of woody plants and to previous plant damage. *Oecologia*. 112:370–378.
- Vasconcelos, H. (1990). Foraging activity of two species of leaf-cutting ants (*Atta*) in a primary forest of the Central Amazon. *Insectes Sociaux*, 37(2):131-145.

- Vazquez Moreno, L. L. y O. Elósegui Claro. (2011). Manejo de epizootias por hongos entomopatógenos. En: *Manual para la adopción del manejo agroecológico de plagas en fincas de la agricultura suburbana*. L. L. Vazquez Moreno (ed.). Volumen I. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana 2011. Capítulo 8, pp. 145-161.
- Verza, S. S., Forti, L. C., Matos, C. A., Garcia, M. G., y Nagamoto, N. S. (2006). Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 47(2), 391-400.
- Vieira-Neto, E. H., Vasconcelos, H. L., y Bruna, E. M. (2016). Roads increase population growth rates of a native leaf-cutter ant in Neotropical savannahs. *Journal of Applied Ecology*, 53(4), 983-992.
- Weber, N. A. (1977). A 10-year colony of *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL7850128061>
- Wetterer, J. K., Gruner, D. S., y Lopez, J. E. (1998). Foraging and nesting ecology of *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) in a Costa Rican tropical dry forest. *Florida Entomologist*, 61-67.
- Wilson, E. O. (1963). The social biology of ants. *Annual Review of Entomology*, 8(1), 345-368.
- Wilson, E. O. (1971). *The insect societies*. Cambridge, Massachusetts, USA, Harvard University Press [Distributed by Oxford University Press.
- Wilson, E. O., y Hölldobler, B. (2005). Eusociality: origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13367–13371. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505858102>
- Wirth, R., Beyschlag, W., Ryel, R., Herz, H. y Hölldobler, B. (2003). The herbivory of leaf-cutting ants. A case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panama. *Springer Verlag*, Berlin. 230 pp.
- Wirth, R., Meyer, S. T., Almeida, W. R., Araújo, M. V., Barbosa, V. S., y Leal, I. R. (2007). Increasing densities of leaf-cutting ants (*Atta* spp.) with proximity to the edge in a Brazilian Atlantic forest. *Journal of Tropical Ecology*, 23(4), 501-505.

Wraight, S. P., Ramos, M. E., Avery, P. B., Jaronski, S. T., y Vandenberg, J. D. (2010). Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of invertebrate pathology*, 103(3), 186-199.

Zanetti, R., Cola Zanuncio, J., Santos, J. C., Da Silva, W. L. P., Ribeiro, G. T., y Lemes, P. G. (2014). An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests*, 5(3), 439-454.

Zanetti, R., Zanuncio, J. C., Vilela, E. F., Leite, H. G., Jaffe, K., y Oliveira, A. C. (2003). Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Sociobiology*, 42(2), 433-442.

Zanetti, R., Vilela, E. F., Zanuncio, J. C., Leite, H. G., y Freitas, G. D. (2000). Influência da espécie cultivada e da vegetação nativa circundante na densidade de saueiros em eucaliptais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 1911-1918.