

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

“Determinación de la capacidad entomopatógica de diferentes hongos contra pulgones.”

Mención: Hortofruticultura y jardinería.
Modalidad: Técnico-experimental.

Curso 2019/2020

Alumno/a:
Jorge Miranda Sánchez

Director/es:
Milagrosa Santos Hernández
Alejandro Moreno Gavira



Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que me han ayudado a acabar este proyecto y esta etapa de mi vida.

A mi familia que siempre me ha apoyado y preocupado por mí, desde el inicio hasta el final. Mención especial a mis padres y mi hermano, sin su apoyo todo hubiera sido mucho más difícil. Deseando que estén orgullosos de mí.

Otro pilar fundamental han sido mis amigos de toda la vida, por permitirme evadirme cuando las cosas no salían todo lo bien que uno quería. Por los momentos y recuerdos.

No quiero olvidarme de mis compañeros de clase, que han vivido lo mismo y saben que es una satisfacción llegar al final. Darles las gracias y mi admiración por estar siempre dispuestos a echar una mano cuando era necesario.

En último lugar a los profesores que me han ayudado a terminar este proyecto. Pero también recordar aquellos profesores que siempre han mostrado colaboración y amabilidad para poder llegar a este momento. Siempre estaré agradecido.

ÍNDICE

1.-Memoria descriptiva.....	7
1.1.- Control biológico.....	8
1.1.1.- Historia y Origen.....	8
1.1.2.- Definición.....	8
1.1.3.- Control biológico y lucha integrada de plagas en Almería.....	9
1.2.- Lucha integrada del pulgón o áfido.....	11
1.2.1.- Introducción y áfidos en Almería.....	11
1.3.- Características de los áfidos.....	12
1.3.1.- Ciclo de vida del pulgón.....	12
1.3.2.- Daños.....	15
1.4.- Especies de pulgones utilizadas en el estudio.....	16
1.4.1.-Características.....	16
➤ <i>Aphis gossypii</i> Glover:.....	16
➤ <i>Melanaphis sacchari</i>	17
➤ <i>Myzus persicae</i>	17
➤ <i>Rhopalosiphum padi</i>	18
1.5.- Control de áfidos mediante hongos entomopatógenos.....	19
1.5.1- Descripción de hongo entomopatógeno.....	19
1.5.2.- Mecanismos de acción del hongo sobre la plaga.....	19
1.5.3.- Casos relevantes de hongos entomopatógenos en plagas.....	20
1.6.-Hongos entomopatógenos utilizados en el ensayo para el control de áfidos.....	20
1.6.1.-Características.....	20
➤ <i>Trichoderma</i> sp.....	20
▪ <i>Trichoderma saturnisporum</i> y <i>aggressivum</i>	21
➤ <i>Cladosporium</i> sp.....	21
➤ <i>Penicillium</i> sp.....	22
2.-Fases de la realización y su cronograma asociado.....	23
2.1.-Fases:.....	23
2.2.- Cronograma asociado:.....	24
3.-Competencias de la titulación integradas en el desarrollo del proyecto.....	24
4.-Especificaciones y requerimientos técnicos.....	25
4.1.- Ubicación de los Áfidos.....	25
4.2.- Material fúngico.....	27
4.3.- Extracción de esporas y conteo de esporas.....	29

4.4.- Preparacion del ensayo.....	33
4.5.- Pulverización	40
4.6.- Parasitismo.....	41
5.- Resultados y discusión.	42
5.1.-Gráficas de <i>Aphis gossypii</i>	42
5.1.1.-Gráficas de mortalidad medio.....	42
5.1.2.- Porcentaje de mortalidad corregido Abbot.....	46
5.2.- Gráficas <i>Melanaphis sacchari</i>	47
5.2.1 Graficas porcentaje mortalidad medio.	47
5.2.2.- Porcentaje de mortalidad corregido Abbot.....	51
5.3.-Gráficas de <i>Myzus persicae</i>	52
5.3.1.- Graficas porcentaje mortalidad medio.	52
5.3.2.- Porcentaje de mortalidad corregido Abbot.....	56
5.4.-Gráficas de <i>Rhopalosiphum padi</i>	56
5.4.1.- Graficas porcentaje mortalidad medio.	56
5.4.2.- Porcentaje de mortalidad corregido Abbot.....	60
5.5.-Discusión de datos de otros ensayos	60
5.6.-Parasitismo discusión	62
6.- Conclusiones	63
7.- Bibliografía.....	64

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.

Imágenes

Imagen 1: <i>Myzus persicae</i>	13
Imagen 2: Ciclo monoécico de pulgón en una sola planta hospedadora	13
Imagen 3: Ciclo de vida holocíclico y heteroécico del pulgón del cereal <i>R. padi</i>	14
Imagen 4: Hembra áptera de <i>Aphis gossypii</i>	16
Imagen 5: Hembra áptera y ninfa de <i>Melanaphis sacchari</i>	17
Imagen 6: Hembra áptera de <i>Myzus persicae</i>	18
Imagen 7: Hembra áptera de <i>Rhopalosiphum padi</i>	19
Imagen 8: Pámpano de <i>Vitis vinifera</i> con población de <i>Aphis gossypii</i>	25
Imagen 9: Brote tierno de <i>Nerium oleander</i> con población de <i>M. sacchari</i>	26
Imagen 10: Colonia de <i>Myzus persicae</i> alimentándose en hoja de <i>C.annuum</i>	26
Imagen 11: Planta bunker de <i>Hordeum vulgare</i> con una colonia de <i>R. padi</i>	27
Imagen 12: <i>Trichoderma aggressivum</i> nombrada en el ensayo como TA.	27
Imagen 13: <i>Trichoderma saturnisporum</i> nombrada en el ensayo como TS.....	28
Imagen 14: <i>Cladosporium sp</i> denominada en el ensayo Cl.....	28
Imagen 15: <i>Penicillium sp</i> nombrado en el ensayo como CONT.....	29

Imagen 16: Vertido de agua estéril a placa Petri.	29
Imagen 17: Raspado de superficie de la placa Petri con una varilla de vidrio.	30
Imagen 18: Mechero Bunsen para la desinfección del material utilizado.....	30
Imagen 19: Recipiente con concentración de esporas.	31
Imagen 20: Agitador de esporas.	31
Imagen 21: Hemocitómetro al microscopio.	32
Imagen 22: Introducción de la concentración de esporas diluidas mediante una micropipeta	32
Imagen 23: Recipientes modificados y recipiente nombrado.....	33
Imagen 24: Recipientes desinfectados con hipoclorito de sodio 5%.	34
Imagen 25: Paquete de algodones esterilizados en autoclave.	34
Imagen 26: Humectación de los algodones y su posterior secado.	35
Imagen 27: Introducción de los algodones en los recipientes mediante unas pinzas desinfectadas.	35
Imagen 28: Material de <i>Nerium oleander</i> cortado en fragmentos pequeños.	36
Imagen 29: Desinfección del material vegetal de <i>Capsicum annuum</i> mediante agua esterilizada e hipoclorito de sodio al 5%.....	36
Imagen 30: Secado de material vegetal <i>Vitis vinifera</i> en papel de filtro.....	37
Imagen 31: Fragmentos de <i>Hordeum vulgare</i> colocados sobre algodón esterilizado en un recipiente	37
Imagen 32: Pulgones de la especie <i>Rhopalosiphum padi</i> en material vegetal de <i>Hordeum vulgare</i> en su respectivo recipiente.....	38
Imagen 33: Pulgones de la especie <i>Melanaphis sacchari</i> en material vegetal de <i>Nerium oleander</i> en su respectivo recipiente.....	38
Imagen 34: Pulgones de la especie <i>Aphis gossypii</i> en material vegetal de <i>Vitis vinifera</i> en su respectivo recipiente	39
Imagen 35: Pulgones de la especie <i>Myzus persicae</i> en material vegetal de <i>Capsicum annuum</i> en su respectivo recipiente	39
Imagen 36: Pulverización de los hongos entomopatógenos en la campana de extracción mediante un pulverizador.	40
Imagen 37: Estufa.....	41
Imagen 38: PDA con pulgones e la especie <i>Melanaphis sacchari</i> sin desinfectar. Parasitados en la cutícula por <i>Penicillium sp.</i>	62
Imagen 39: PDA con pulgones desinfectados de la especie <i>Aphis gossypii</i> . Parasitados en el interior del organismo por <i>Penicillium sp.</i>	62

Tablas

Tabla 1: Pulgones más importantes que atacan a los cultivos protegidos del sureste español.....	15
Tabla 2: Temperatura y actividad del agua necesarias para el crecimiento de algunas especies de <i>Penicillium</i>	23
Tabla 3: Representación de LT50 frente a <i>Aphis gossypii</i>	45
Tabla 4: Representación de LT50 frente a <i>Melanaphis sacchari</i>	49
Tabla 5: Representación de LT50 frente a <i>Myzus persicae</i>	54
Tabla 6: Representación de LT50 frente a <i>Rhopalosiphum padi</i>	59

Gráficas

Gráfica 1: Porcentaje de mortalidad medio de T0 (control)	42
Gráfica 2: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Trichoderma aggressivum</i>	43
Gráfica 3: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Trichoderma saturnisporum</i>	43
Gráfica 4: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Cladosporium sp.</i>	44
Gráfica 5: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Penicillium sp.</i>	44
Gráfica 6: Porcentaje de mortalidad medio para cada tratamiento medido a los 3 días del ensayo.	45
Gráfica 7: Porcentaje de mortalidad corregido que se produce a los 3 días.....	46
Gráfica 8: Porcentaje de mortalidad medio de T0.	47
Gráfica 9: Porcentaje de mortalidad medio <i>Trichoderma aggressivum</i>	47
Gráfica 10: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Trichoderma saturnisporum</i>	48
Gráfica 11: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Cladosporium sp.</i>	48
Gráfica 12: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Penicillium sp.</i>	49
Gráfica 13: Porcentaje de mortalidad medio para cada tratamiento medido a los 3 días del ensayo.	50
Gráfica 14: Porcentaje de mortalidad corregido de Abbot a los 3 días de tratamiento.....	51
Gráfica 15: Porcentaje de mortalidad medio de T0.	52
Gráfica 16: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Trichoderma aggressivum</i>	52
Gráfica 17: Porcentaje de mortalidad medio de <i>T. saturnisporum</i>	53
Gráfica 18: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Cladosporium sp.</i>	53
Gráfica 19: Porcentaje de mortalidad de <i>Penicillium sp.</i>	54
Gráfico 20: Porcentaje de mortalidad medio total de los 4 hongos entomopatógenos.....	55
Gráfica 21: Porcentaje de mortalidad corregido de Abbot a los 3 días de tratamiento.	56
Gráfica 22: Porcentaje de mortalidad medio de T0.	56
Gráfica 23: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Trichoderma aggressivum</i>	57
Gráfica 24: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Trichoderma saturnisporum</i>	57
Gráfica 25: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Cladosporium sp.</i>	58
Gráfica 26: Porcentaje de mortalidad medio de <i>Penicillium sp.</i>	58
Gráfica 27: Porcentaje de mortalidad medio para cada tratamiento medido a los 3 días del ensayo.	59
Gráfica 28: Porcentaje de mortalidad corregido de Abbot a los 3 días de mortalidad.	60

Resumen

Los áfidos o pulgones era una plaga sin apenas protagonismo en el sureste español, debido a la utilización de plaguicidas selectivos de pulgones que utilizaban como materia activa Pirimicarb. Como consecuencia de la evolución del campo almeriense a una agricultura más ecológica e incluso sin residuos en los frutos de fitosanitarios, ha provocado un aumento de los daños ocasionados por estos organismos nocivos. Con respecto a su control existen parasitoides como *Aphidius colemani* que es una alternativa eficaz, pero en ciertos momentos es insuficiente para controlar las poblaciones de estos áfidos, debido a la elevación de las temperaturas entre los meses de Abril hasta comienzo del verano. El objetivo de este proyecto fue identificar y evaluar la capacidad entomopatógica de 4 hongos contra 4 especies de pulgones. Los hongos utilizados fueron: *Trichoderma aggressivum*, *Trichoderma saturnisporum*, *Cladosporium sp* y *Penicillium sp*. Las 4 especies de pulgones: *Aphis gossypii*, *Melanaphis sacchari*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi* fueron tratados mediante pulverización con una concentración de $1,5 \times 10^7$ conidias ml^{-1} y un control T0 con agua estéril. Después de producirse el 100% de mortalidad en las 4 especies, se logró un control en la especie *R. padi* mediante *T. aggressivum*, *Penicillium sp* y *Cladosporium sp* con incrementos de mortalidad con respecto al control de un 18,1%, 14,7% y 11,5% respectivamente. También se logró un control en la especie *M. sacchari* mediante *T. aggressivum*, *Penicillium sp* y *Cladosporium sp* con incrementos de mortalidad con respecto al control de un 38,8%, 38,6% y 35,3% respectivamente. Para *Aphis gossypii* y *Myzus persicae* no se obtuvieron datos significativos.

Abstract

Aphids was a pest with little prominence in southeastern Spain, due to the use of aphid selective pesticides that used Pirimicarb as their active material. As a consequence of the evolution of the Almerian countryside to a more ecological agriculture and even without residues in the fruits of plant protection products, it has caused an increase in the damage caused by these harmful organisms. Regarding its control, there are parasitoids such as *Aphidius colemani*, which is an effective alternative, but at certain times it is insufficient to control the populations of these aphids, due to the rise in temperatures between the months of April to the beginning of summer. The objective of this project was to identify and evaluate the entomopathogenic capacity of 4 fungi against 4 aphid species. The fungi used were: *Trichoderma aggressivum*, *Trichoderma saturnisporum*, *Cladosporium sp* and *Penicillium sp*. The 4 species of aphids: *Aphis gossypii*, *Melanaphis sacchari*, *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi* were treated by spraying with a concentration of $1,5 \times 10^7$ conidia ml^{-1} and a T0 control with sterile water. After 100% mortality occurred in the 4 species, a control was achieved in the *R. padi* species by *T. aggressivum*, *Penicillium sp* and *Cladosporium sp* with increases in mortality with respect to the control of 18.1%, 14, 7% and 11.5% respectively. Control was also achieved in the species *M. sacchari* by *T. aggressivum*, *Penicillium sp* and *Cladosporium sp* with increases in mortality with respect to the control of 38.8%, 38.6% and 35.3% respectively. No significant data were obtained for *Aphis gossypii* and *Myzus persicae*.

1.-Memoria descriptiva

1.1-Control biológico.

1.1.1-Historia y Origen

Los primeros datos recogidos sobre la utilización de enemigos naturales frente a plagas, tiene lugar en el 324 a.c. en China. Los agricultores chinos utilizaban una especie de hormiga *Oecophylla smaragdina* como método de control, ya que son efectivas contra muchas plagas de los cítricos (DeBach, 1974). Este método consistía en introducir en los campos de cítricos los nidos de esta especie de hormiga, las cuales llegaban de árbol en árbol por la construcción de puentes hechos por los agricultores, reduciendo los daños provocados por lepidópteros y coleópteros (Lavandero et al., 2006). Este desarrollo sofisticado de control de plagas, se produjo por el interés chino en la crianza de gusanos de seda, pero sobretodo por su estudio de las cadenas alimenticias y mecanismos de control natural de plagas (Cano et al., 2004).

Sin embargo, en Europa el estudio de control biológico de plagas no estaba tan desarrollado ya que se basaban más en hechos religiosos, que en conocimientos científicos, como la colocación de oraciones en palos como medida de control sobre la langosta (Acrididae). Posteriormente en la época del Renacimiento (1675) con la invención del microscopio y el descubrimiento de las bacterias, se apostó por los conocimientos científicos frente a los religiosos.

A principios del siglo XIX se intensificó los métodos de control biológico de plagas, donde podemos destacar a Erasmo Darwing (1800) el cual observó que los parasitoides eran capaces de provocar la muerte de las larvas del follaje en el repollo, el parasitoide en cuestión era de la familia *Ichneumonidae*. Pero uno de los mayores éxitos de control biológico (1890) fue provocado casi de manera accidental por la introducción de una especie invasora de cochinilla procedente de Australia (1860), la escama blanca del algodón *Icerya purchasi*, en la región de California la cual afectaba a los cítricos. Estados Unidos utilizó como medida de control frente a esta plaga invasora de Australia, un organismo vivo capaz de reducir la población de esta cochinilla drásticamente y efectivamente, se trataba del escarabajo *Rodolia cardinalis* procedente de Australia, ya que se había comprobado que funcionaba excelentemente como control biológico.

Otro ejemplo de la eficacia y la importancia del control biológico de organismo en el mundo, se produjo en 1926 también en Australia. En este caso se trata en el control de un cactus invasor *Opuntia aurantiaca* mediante la utilización de un lepidóptero *Cactoblastis cactorum*, ya que su larva se alimenta de este cactus controlando su población.

A lo largo de la historia se ha utilizado el control biológico de organismos, como una herramienta eficaz en la reducción de la población de una plaga nociva para los cultivos. Hoy en día es muy importante en zonas de todo el mundo, como es el caso del sureste español.

1.1.2-Definición

A lo largo de la historia se han utilizado numerosas definiciones para definir control biológico de plagas. Pero podemos destacar que la Organización internacional de Control Biológico (IOBC) lo define como "La utilización de

organismos vivos, de sus recursos, o de sus productos, para prevenir o reducir las pérdidas o daños causados por organismos nocivos”. Esta definición esta apoyada en la descrita por Balachowsky (1951) “conjunto de métodos que aseguran la destrucción de insectos mediante la utilización racional de sus enemigos naturales pertenecientes tanto al reino animal como al reino vegetal”.

1.1.3-Control biológico y lucha integrada de plagas en Almería

1.1.3.1-Introducción

A principios de los años 70, se construyeron los primeros invernaderos en Almería, la cual se desarrolló rápidamente por el litoral e interior (Díaz et al., 2008). Estos invernaderos eran de “tipo parral” y con la introducción del enarenado se consiguió un microclima bastante favorable para el desarrollo de distintos cultivos en su interior. Esto provocó un aumento en el número de hectáreas de invernadero en la comarca de Almería, pasando de 1.114 Ha en 1971 a 27000 Ha en 1996 (Palomar Oviedo, 1994). Con este aumento de hectáreas y con la mejora tanto tecnológica y estructural de los invernaderos se aumentó los rendimientos de las cosechas, pero esto provocó un aumento de la presión de plagas enfermedades en los cultivos almerienses, aumentando las pérdidas de cosecha. El principal y único método utilizado era la utilización masiva de insecticidas sistémicos (Cabello y Cañero, 1994). Lo que causó una gran problemática en ese momento, estableciéndose mayores controles y elevando la exigencia en la disminución de pesticidas en los productos. Por lo que se planteó el uso de control integral de plagas como una solución a la reducción del uso de fitosanitarios. Según los datos aportados por la Junta de Andalucía se consiguió pasar de 129,10 Ha que utilizaban control integrado de plagas en la campaña 2005/2006 a unas 26590 Ha en la campaña 2015/2016.

1.1.3.2- Problemática de los plaguicidas en Almería

Uno de los grandes problemas que presentó la agricultura Almeriense fue el uso casi exclusivo del control químico para control de enfermedades y plagas, las sustancias químicas utilizadas eran los llamados plaguicidas, pesticidas o agrotóxicos. Este tipo de productos químicos se antepusieron frente a otros métodos de control de plagas, debido a su bajo coste en relación al beneficio en la reducción de pérdidas de cosecha, su fácil disponibilidad y aplicación, pero lo que más interesaba desde el punto de vista del agricultor de la década de los años 60 y 70 era su gran efectividad en la reducción de las enfermedades y organismos dañinos al cultivo (Santos et al., 2010).

Este método de control químico exclusivamente se mantuvo en el tiempo hasta la década de los 90 e inicios del 2000, provocado por la aparición de problemas a causa de una excesiva aplicación de estos plaguicidas. Entre las causas de la disminución del uso de pesticidas y el interés de buscar soluciones alternativas, proviene de una serie de problemáticas que surgieron en aquella época. Según (Cano et al., 2004) las causas principales eran:

- Los plaguicidas inorgánicos provocaban daños a la salud por su persistencia y toxicidad.

- Pérdida de eficacia de los pesticidas (Aparición de resistencias frente a materias activas presente en ellos).
- Resurgencia de plagas, es decir, cuando se aplicaba se reducía el número de individuos, pero pasado un tiempo subía a niveles mayores consecuencia de la eliminación de los enemigos naturales.
- Aparición de plagas secundarias que antes no lo eran.
- Gran problema al contaminar el medio ambiente.
- Entrada de cepas más virulentas.

Sumado a todos los problemas descritos anteriormente hay que añadir el aumento de la presión de Europa, para reducir los límites de residuos presentes en los productos almerienses. Por lo que el primer laboratorio de análisis de residuos se construyó en 1986 (López, 1989), analizando el producto antes de ser enviado al mercado, ya que los países importadores del producto almeriense marcan los niveles de residuos máximo admisible para la entrada en el país importador.

Por tanto el uso exclusivo de control químico en la provincia era imposible de mantener, provocando la búsqueda de otras alternativas eficaces pero también con baja capacidad dañina tanto al medio ambiente, como a la salud de los seres humanos. Por lo que la lucha integrada de plagas cada vez era una realidad más cercana.

1.1.3.3.-Aparición de la lucha integrada de plagas en Almería.

1.1.3.3.1.-Definición

Según la Organización Internacional para el Control Biológico e Integrado (O.I.L.B) define lucha integrada de plagas (IPM) como: «Un conjunto de métodos que satisfaga las exigencias a la vez económicas, ecológicas y toxicológicas, reservando la prioridad a la utilización deliberada de elementos naturales de control y respetando los límites de tolerancia».

Otra definición que podemos destacar de lucha integrada de plagas es la propuesta por Raven et al. (1993) "Una combinación de métodos de control (biológico, químico, cultural) que si se utilizan en el orden y tiempo correctos, mantienen la población de patógenos por debajo del umbral de daño económico".

1.1.3.3.2.-Desarrollo en Almería

Al inicio de los años 90, se desarrollaron unos primeros estudios que permitieron un mayor conocimiento del sistema agrario. Estos estudios tuvieron una gran importancia en el conocimiento de los agentes de control natural como mecanismos de control frente a plagas. Lo que produjo una serie de diversos convenios específicos de colaboración entre la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía y Entidades Agrarias de la provincia de Almería para el desarrollo y optimización de la producción Integrada en los invernaderos de Almería (Salmerón et al., 2001). Un programa pionero fue la creación de ATRIAS o invernaderos experimentales (Agrupaciones de tratamientos integrados en agricultura), lo que permitió un avance en las diversas técnicas de lucha integrada (Aparicio et al., 2001). Por lo que en Almería se empezó a utilizar una combinación tanto en la utilización de plaguicidas en momentos puntuales, como la utilización de

organismos de control biológico para disminuir el daño causado por la plaga, provocando el menor impacto posible en el medio ambiente (Stern et al., 1959).

Una vez comprobado que la Lucha Integrada de Plagas era el camino adecuado para un buen desarrollo del sistema agrario, además de sus beneficios, en Almería se desarrolló con la ayuda de la Junta de Andalucía, el denominado “Compromiso verde” el cual prioriza el control biológico de plagas, los aspectos recomendados para controlar las enfermedades víricas en cultivos hortícolas protegidos, el uso sostenible de fitosanitarios, la utilización masiva de trampas cromotrópicas, la hermeticidad de las estructuras, la gestión de restos vegetales y las condiciones de almacenamiento de productos fitosanitarios. Este “Compromiso verde” provocó la “Revolución verde” del campo almeriense, ya que se pasó de 129,10 Ha. de control biológico en la campaña 2005/2006 a 26.596 Ha. en la campaña 2015/2016.

En la actualidad, las empresas comercializadoras que quieran vender las hortalizas con el distintivo de marca de garantía, deben pasar una serie de controles de calidad. Además los agricultores deben de declarar la superficie de producción y así como cumplir los reglamentos que regulan la producción Integrada. Esto ha permitido establecer una trazabilidad de los productos en caso de alguna alerta por la utilización de fitosanitarios prohibidos o por superar los límites de residuos en el producto. La trazabilidad se define como: “La posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución, de un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinados a ser incorporados en alimentos o piensos o con probabilidad de serlo” (Cañizares et al., 2014).

1.2- Lucha integrada del pulgón o áfido.

1.2.1.-Introducción y áfidos en Almería.

En el mundo existen más de 5300 especies de pulgones (Remaudière, g. y Remaudière, m. 1997). De esas 5300 especies, en Andalucía se encuentran más de 211 especies y subespecies de áfidos (Durante et al., 1990).

Los áfidos o pulgones era una plaga sin apenas protagonismo en los años de mayor uso de plaguicidas debido a la existencia de pirimicarb, al ser un plaguicida selectivo de pulgones (Ramakers, 2004), ya que eran fácil de reducir su población y eliminarla. Pero con la presencia de la Lucha Integrada ha cobrado un importante protagonismo en el campo almeriense.

Por otro lado, la zona del sureste español está en constante evolución, buscando alternativas en los mercados europeos, como es el caso de la agricultura ecológica en invernadero o la no utilización de plaguicidas sistémicos que puedan suponer la aparición de residuo en fruto, intentando conseguir el ya conocido “Residuo 0”. Con todo esto, se han agravado los problemas en algunos cultivos como las cucurbitáceas y sobretodo en los cultivos basados en la utilización de productos exclusivamente ecológicos. Respecto a su control biológico mediante *Aphidius colemani* es una alternativa bastante eficaz, pero en ciertos momentos es insuficiente para controlar los focos de pulgón, sobretodo cuando las condiciones son las más favorables para el ciclo de vida del pulgón desde a principios de Abril hasta el comienzo del verano debido a las elevación de las temperaturas, además

uno de los problemas que aparecen es que las hormigas protegen a los pulgones de este parasitoide, lo que supone otro problema (Beltrán et al., 2012).

1.3.-Características de los áfidos.

Los pulgones pertenecen al Orden Hemiptera, suborden *Sternorrhyncha*, Familia *Aphididae* y superfamilia *Aphidoidea*. El tamaño medio de cada individuo varía entre especies, siendo esta variación entre 0,5 y 4,5 mm. Presentan un cuerpo globoso, blando y su forma varía de circular a fusiforme y puede presentar una cutícula desnuda, cubierta de excreciones cerosas, rugosa e incluso espinulada (Mier y Nieto, 1998). Su cabeza se caracteriza por tener antenas filiformes de 3-6 segmentos, las cuales presentan numerosas sensorias conocidas como “rhinarias”, teniendo dos rinarios primarios en el ápice del penúltimo y otro en la base del último segmento. Su cuerpo presenta casi siempre dos cornículos o sifones en forma de tubo, situándose en el 5º o 6º segmento abdominal, incluso pueden secretar un fluido de defensa (Cancino, 1997). En la parte trasera del abdomen se encuentra un último segmento en forma de cauda, una placa anal y un genital posterior a la cauda (Peña- Martínez, 1985). Respecto a su aparato bucal, se caracteriza por ser de tipo picador-chupador (Miyazaki, 1987b). En él se ha modificado el labio, formándose un pico con cuatro estiletes debido a la evolución de las dos mandíbulas y maxilas, que se acoplan formando un filamento prolongado con 2 conductos, formando el sistema de alimentación del áfido. El primer conducto (el canal salival), permite que el pulgón inyecte la saliva para disolver la savia, una vez que haya picado en la hoja y haya introducido los estiletes. El segundo conducto (el canal alimenticio), permite absorber la savia disuelta.

1.3.1.-Ciclo de vida del pulgón.

Según Caver (1991), los pulgones presentan dos características particulares que le hacen ser una plaga con un gran éxito en su propagación:

- ✓ Alta fecundidad.
 - Partenogénesis
 - Viviparidad
 - Polimorfismo
- ✓ Alternancia de plantas hospedadoras.

Partenogénesis: Las hembras de los áfidos pueden producir nuevas generaciones sin necesidad de aparearse con un macho.

Viviparidad: Las hembras contienen embriones dentro de su cuerpo, estos embriones son “paridos” por la hembra.

Los pulgones presentan diferentes generaciones de organismos: Alados y ápteros, sexuales y asexuales.



Imagen 1: *Myzus persicae*. A la izquierda forma alada, a la derecha forma áptera adulta. Se señala la cauda (c) y los sifones (s) (García Marí et al, 1989a citado en Zamora et al, 2008).

Los pulgones presentan dos tipos de ciclos:

- **Ciclo holocíclico y Monoécico:** las generaciones de pulgones se desarrollan en una sola planta hospedadora. El ciclo comienza con un huevo puesto por una hembra ovípara antes del invierno. Una vez que llega la primavera eclosiona el huevo, naciendo una hembra áptera llamada fundadora o fundatrix, la cual es partenogenética y vivípara. La fundadora dará lugar a diferentes generaciones de hembras partenogenéticas, vivíparas, ápteras y aladas llamadas fundatrigenas. Las fundadoras se diferencian de las fundatrigenas ya que presentan antenas, sífúnculos más pequeños. Por otro lado las aladas son las encargadas de la expansión de la generación a otra planta hospedadora. En otoño, las fundatrigenas dan lugar a hembras sexúparas, las cuales son partenogenéticas y aladas que depositan huevos, dando lugar a pulgones ya sexuados, tanto machos como hembras ovíparas, esta nueva generación anfigónica se aparean y producen los huevos invernantes, depositándolos en la planta para su posterior eclosión en primavera (Zamora et al., 2008; Barbagallo et al., 1998; Williams y Dixon, 2007).

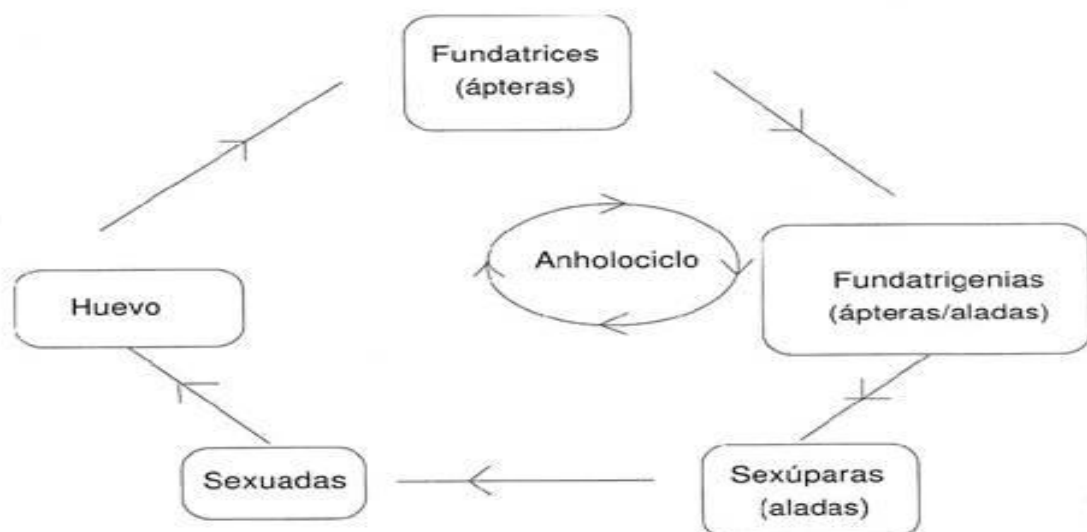


Imagen 2: Ciclo monoécico de pulgón en una sola planta hospedadora. (Liñán, 1998 citado en Zamora et al., 2008).

- **Ciclo Holocíclico y Heterocia:** este ciclo es exactamente igual al ciclo monoécico, la gran diferencia que hay es cuando las fundatrigenas aladas emigran a otras plantas diferentes a la primaria, recibiendo el nombre de emigrantes. En esta segunda planta hospedadora se forman nuevas generaciones dando lugar a hembras siempre partenogenéticas, vivíparas, aladas y ápteras las cuales reciben el nombre de virginóparas o exiladas. Cuando llega el otoño las sexúparas, se aparean dando a los individuos sexuados que depositan el huevo de invierno. Puede darse el caso que la hembra alada sexuada vuelva a la planta primaria y allí nacen los sexuados (Zamora et al., 2008).

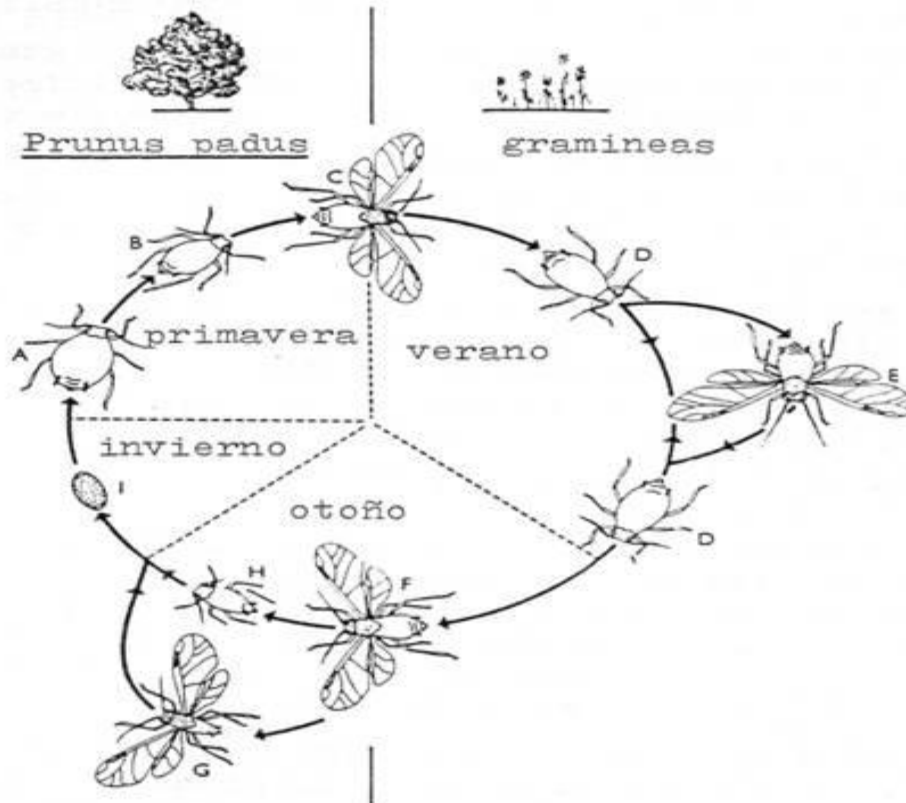


Imagen 3: Ciclo de vida holocíclico y heterocíclico del pulgón del cereal *Rhopalosiphum padi*. (García Marí et al., 1989a citado en Zamora et al., 2008).

- A) Hembra fundadora
- B) Fundatrígena áptera
- C) Emigrante
- D) Exilada áptera
- E) Exilada alada
- F) Sexúpara alada
- G) Macho alado
- H) Hembra ovípara áptera
- I) Huevo

- **Ciclo anholociclo:** Se caracteriza por no presentar generación anfígónica, por lo que solo aparecen hembras partenogenéticas tanto ápteras como aladas durante todo el año. Generalmente este ciclo ocurre con temperaturas más elevadas, evitando temperaturas inferiores a 5°C y siempre y cuando

exista alimento para alimentar a la población de áfidos (Barbagallo et al., 1998).

1.3.2.-Daños

Los pulgones o áfidos (Homoptera: Aphididae) son responsables de la reducción del rendimiento y/o calidad de los frutos cosechados, debido a sus daños tanto directos al ser insectos chupadores de sabia elaborada (Debilitan a la planta, deformación de hojas, etc.) como indirectos (Trasmisores de virus: CMV, TSWV. Producen melaza que asienta al hongo denominado “Negrilla”), además los pulgones adquieren una gran importancia por los tipos de virus que puede transmitir (Potyvirus y Cucumovirus) (Fereres, 1991).

Los pulgones pueden transmitir el virus de forma persistente o no persistente.

Para que un áfido pueda transmitir un virus de manera persistente, necesita alimentarse del floema de la planta con un mínimo de tiempo de 20 minutos. Una vez en el organismo, pasan por el tracto digestivo a las glándulas salivales, transmitiendo el virus mediante su inoculación en la planta.

Para que se transmita de forma no persistente, el pulgón obtiene las partículas víricas de las células epidérmicas de la planta infectada, en un tiempo muy corto de minutos e incluso segundos. Se diferencia de la forma persistente debido a que las partículas virales no llegan al tracto digestivo sino que se quedan retenidas en el estilete durante un periodo corto de tiempo, transmitiéndose mediante ingestión-salivación (López et al., 2013; Lozano, 2005).

Entre los cultivos protegidos del sureste español, existen numerosas especies de pulgón que causan daños económicos en los diferentes cultivos hortícolas, destacando los más dañinos:

Pulgón	Melón	Sandía	Calabacín	Pimiento	Tomate	Berenjena	Judía
<i>Aphis fabae</i>			X	X	X	X	X
<i>Aphis gossypii</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>Myzus persicae</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>Aulacorthum solani</i>				X	X	X	
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>			X	X	X	X	X

Tabla 1: Pulgones más importantes que atacan a los cultivos protegidos del sureste español (Blackman y Eastop, 1985).

Además de la transmisión de virus que es uno de los problemas más destacados, se encuentra la producción de melaza, la cual atrae al hongo denominado “negrilla”, el cual provoca una reducción de la tasa fotosintética de la planta y también reduciendo el valor estético del fruto que repercute en el precio final de mercado.

1.4.- Especies de pulgones utilizadas en el estudio.

Las especies utilizadas en este ensayo son las siguientes:

- *Aphis gossypii*
- *Melanaphis sacchari*
- *Myzus persicae*
- *Rhopalosiphum padi*

1.4.1.-Características

- ***Aphis gossypii* Glover:**

Esta especie de pulgón se le conoce también como el pulgón del algodón o pulgón del melón. Se caracteriza por presentar coloraciones variables desde negro, amarillo, verde claro, pudiendo confundirse con otras especies. La coloración es dependiente de la alimentación, la densidad de población y la temperatura. A temperaturas más elevadas presentan una coloración más clara, mientras a temperaturas más suaves presentan coloraciones más oscuras. Las hembras adultas ápteras miden entorno a 1,2 y 2,1 mm de longitud, destacan sus sifones que siempre son cortos y de color negro. Las hembras aladas miden entre 1,2 y 1,8 mm de longitud, siendo de tamaño menor a la áptera, presentan sifones negros y patas de color grisáceo. Tanto la áptera y alada presentan aparato chupador-picador (Costa-Comelles et al., 1994)

Su reproducción es partenogénica durante todo el año presentando hembras vivíparas, desapareciendo la fase sexuada, siendo su temperatura óptima de reproducción a los 24°C, mudando 4 veces antes de llegar a la fase adulta.

Los cultivos atacados por esta especie de pulgón son: algodón, cucurbitáceas, vid, cítricos y solanáceas. Presentando daños bastante importantes en los diferentes cultivos, tanto de forma indirecta por la generación de melaza que favorece al hongo que ocasiona la negrilla, como de forma directa provocando deformaciones en hojas, enrollamientos, debilitamiento y amarillamiento de la planta. También es conocida esta especie por ser capaz de transmitir 50 virus diferentes, destacando un virus importante en cucurbitáceas el virus del mosaico del pepino (CMV) y también es vector del virus de la tristeza en los cítricos (Citrus Tristeza Virus, CTV). Estos áfidos se sitúan en el envés de la hoja y se distribuyen por focos, entrando dentro del invernadero tanto por las bandas como por las ventanas siendo estos lugares los más propensos a aparecer el foco inicial (Costa-Comelles et al., 1994).



Imagen 4: Hembra áptera de *Aphis gossypii* (Servicio de Sanidad Vegetal de la Consejería de Agricultura de la Junta de Andalucía en Almería y del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).

➤ ***Melanaphis sacchari***

Esta especie de pulgón es también conocida como el “pulgón amarillo del sorgo (PAS)” o “pulgón verde de la caña de azúcar”, es una plaga exótica, originaria de África y del medio Oriente. Hoy en día se encuentra distribuido en todos los continentes, excepto la Antártida (Senasica, 2014). Las principales especies de plantas hospedadoras atacadas por *Melanaphis sacchari* son varias especies de *Poaceae*, géneros *Sorghum* y *Saccharum* (Denmark, 1988).

Según Blackman y Eastop (1984) esta especie de áfido alcanza un tamaño de 1,1-2,0 mm, presentando una coloración variable dependiendo de la planta hospedante, pasando de amarillo hasta incluso púrpura, presentando unas marcas escleróticas oscuras. Las hembras ápteras presentan una cauda de color café, mientras que los cornículos son cortos y miden la mitad del cuerpo. Una característica notoria es la presencia de manchas oscuras en el abdomen.

Los daños más destacados son durante las últimas etapas de crecimiento y en climas secos, provocando en la planta hospedadora la presencia de manchas o rayas rojizas, además de la producción de melaza. Son vectores del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) y el sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) (Senasica, 2014).



Imagen 5: Hembra áptera y ninfa de *Melanaphis sacchari* (Nibouche et al. 2018).

➤ ***Myzus persicae***

Esta especie de áfido es conocida como “pulgón verde del melocotonero”. Es un pulgón polífago y cosmopolita afectando a numerosas plantas y cultivos de todo el mundo. Presentando daños importantes en cítricos, en la costa mediterránea. En cultivos hortícolas del sureste español, junto a *Aphis gossypii* es la especie de mayor incidencia, siendo los cultivos afectados: Berenjena, calabacín, judía, melón, pepino, pimiento, sandía y tomate (Tello y Camacho, 2010).

La hembra áptera de *Myzus persicae* tiene una longitud entorno 1,5-2,5 mm, siendo la áptera mayor que la alada. Su coloración es normalmente de color

amarillo o verde, aunque a veces puede ser rojiza (primavera y otoño). Se caracterizan por presentar tubérculos antenales muy pronunciados y convergentes. Tienen antenas largas que se oscurecen gradualmente, sifones más anchos en la parte final y una coloración clara como la cauda. En cuanto a su reproducción suele ser por partenogénesis, pero también de forma sexual, presentando un ciclo holocíclico. Su temperatura óptima de reproducción es de 26°C (Tello y Camacho, 2010).

Sus daños principales en los cultivos son de forma directa, afectando a los brotes tiernos, provocando debilitamiento, amarillamiento de la planta y retraso del crecimiento. De forma indirecta se caracteriza de ser una de las especies de áfidos más importantes en la transmisión de virosis, siendo capaz de ser vector de más de 100 virus, destacando virus como: Virus del mosaico de la alfalfa (AMV), Virus del mosaico del pepino (CMV) y el Virus Y de la patata (PVY), además de la producción de melaza que favorece al hongo denominado “negrilla” (Tello y Camacho, 2010).



Imagen 6: Hembra áptera de *Myzus persicae* (Hortoinfo).

➤ *Rhopalosiphum padi*

Esta especie de pulgón se le conoce como el “pulgón de la avena”. Presenta un tamaño medio de 1,5-2,3 mm de longitud, suelen ser de color verde amarillo hasta color oscuro casi negro. El cuerpo es de mayor tamaño que las antenas, se caracterizan por tener una coloración rojiza en la base de los cornículos y la cauda, siendo estos de color oscuro y presentando un estrechamiento gradual hacia el ápice (Dughetti, 2012).

Para su ciclo de vida necesita 2 plantas hospederas (Ciclo holocíclico), un árbol durante el invierno y una gramínea con condiciones climáticas óptimas (Anholocíclico). Su temperatura óptima de reproducción es entorno los 21-25°C.

Según Dughetti (2012) los daños que presenta este áfido, son de forma directa provocando una disminución del crecimiento, afectando a la parte aérea de la planta, los mayores daños se producen en invierno. También destaca por favorecer la presencia de hongos saprófagos como la fumagina. De manera indirecta destaca por ser vector de virus como: El virus del “enanismo amarillo de los cereales” (BYDV) y el Virus Y de la patata (PVY).

En Almería este tipo de Pulgón es utilizado en plantas bunker, como alimento a sueltas controladas de parasitoides, sirviendo de alimento para mantener

una buena población en caso de la entrada de pulgones específicos del cultivo y así estos enemigos naturales empiecen a controlar las infecciones naturales.



Imagen 7: Hembra áptera de *Rhopalosiphum padi* (Consejería de agricultura y pesca de la Junta de Andalucía).

1.5.-Control de áfidos mediante hongos entomopatógenos.

1.5.1-Descripción de hongo entomopatógeno

Se denomina hongos entomopatógenos a los hongos o mycota utilizados para el control biológico de insectos. Estos hongos se encuentran en la naturaleza, tanto en el aire, suelo, agua, etc. Prefieren climas húmedos, frescos y sin sol directo. Existen más de 700 especies reunidas en 100 géneros, pero solo 20 especies han sido estudiadas para el control de plagas, por lo que ha supuesto un desarrollo comercial bastante lento. Aún así es el grupo de mayor importancia como agente de control sobre insectos. Las divisiones más destacadas de estos hongos son 3: Zigomicota (entomoptorales), Deuteromicota (Hifomicetos) y Ascomicota (Hegedus y Khachatourians) (Carballo et al., 2004; Díaz et al., 2006 y Monzón, 2002).

1.5.2.- Mecanismos de acción del hongo sobre la plaga

Para insectos picadores-chupadores como es el caso de los pulgones, los hongos entomopatógenos suponen una excelente ayuda en su control, debido a que su infección se produce por contacto por la cutícula (Díaz, 2014).

Según Monzón (2002) las fases de infección del hongo sobre el insecto son: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción.

El proceso comienza cuando la espora o conidio del hongo se adhiere a la cutícula del insecto, también por las partes bucales, membranas intersegmentales o por los espiráculos. Posteriormente si las condiciones

ambientales son propicias a la germinación de la espora, se forman los túbulos germinales y a veces los apresorios; este tubo germinal (hifa de penetración) se caracteriza por la penetración que hace sobre la cutícula del insecto, introduciéndose en la hemolinfa, provocando la infección del insecto. Una vez que el hongo se desarrolla dentro del insecto, necesita alrededor de 7 a 10 días para completar la colonización completa y provocar su muerte. Cuando se produce la muerte del insecto se forman nuevas esporas, debido a la salida al exterior del micelio, infectando a nuevos insectos. En pulgones es bastante eficaz la propagación del hongo debido a que los pulgones se extienden en colonias dentro de los cultivos (Díaz, 2014).

Monzón (2002) señala que para la penetración del tubo germinal dentro del insecto se necesita un mecanismo físico que ejerza presión y rompa las áreas esclerosadas y membranosas y uno químico producido por enzimas (proteasas, lipasas y quitinasas) capaces de descomponer el tejido. Esto favorece a la entrada de la hifa colonizando el cuerpo, formando colonias y estructuras del hongo que es la parte final del desarrollo de la enfermedad. Otra manera de que el hongo pueda provocar la muerte del insecto es por su capacidad de producción de toxinas, muy dañinas para los insectos.

1.5.3.-Casos relevantes de hongos entomopatógenos en plagas.

Los primeros casos de hongos entomopatógenos para el control de plagas se produjo en el siglo XIX. El primer caso constatado fue en 1879 en Rusia para el control del abejorro *Anisoplia austriaca* mediante el hongo *Metarhizium anisopliae*. Otro ejemplo es el control del escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) mediante el hongo *Beauveria bassiana*; También se ha comprobado que la mosca blanca *Bemisia tabaci* es infectada por diferentes géneros de hongos como *Paecilomyces*, *Aschersonia* y *Verticillium lecanii* en la naturaleza.

1.6.-Hongos entomopatógenos utilizados en el ensayo para el control de áfidos.

Dentro de este trabajo vamos a trabajar con 4 hongos entomopatógenos diferentes:

- *Trichoderma saturnisporum*
- *Trichoderma aggressivum*
- *Cladosporium sp.*
- *Penicillium sp.*

Estos 4 hongos van a ser utilizados como control biológico del pulgón.

1.6.1.-Características

- ***Trichoderma sp.***

Las especies *Trichoderma sp* son hongos cosmopolitas, del orden *Hyphales* y de la familia *Monilaceae*, los cuales se caracterizan por ser agentes de control biológico tanto de hongos como insectos (Hidalgo, 1989). Su investigación como agentes de control comenzó en la década de 1950. Benítez y Rincón (2004) señalan que el éxito de este hongo deriva de su capacidad de sobrevivir en ambientes desfavorables, su alta capacidad de propagación reproductiva, eficiencia

de utilización de nutrientes, capacidad de modificar la rizosfera, su agresividad frente a insectos y hongos. Son hongos que se encuentran principalmente en desechos vegetales en descomposición y materia orgánica.

En cuanto a su morfología presenta un crecimiento micelial rápido y la capacidad de producir gran cantidad de esporas. Presenta conidióforos hiliares ramificados no verticiliados, fíalides simples o en grupos, conidios de un tamaño de diámetro de 3 a 5 μm , ovalados, unicelulares y coloreados de color verde usualmente, se encuentran en racimos terminales pequeños. En estado vegetativo presentan un micelio y septos simples. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Se reproducen asexualmente por conidios. Producen clamidosporas en sustratos naturales, lo que le permite sobrevivir en condiciones desfavorables (Arango, 1988; Barnett y Hunter, 1972 citado por Chávez 2006).

Las condiciones óptimas de desarrollo de temperatura y humedad depende de cada especie (Kredics y col, 2003), su rango de temperaturas oscila entre los 10° y 40°C, pero la temperatura óptima para su desarrollo se sitúa entre los 15° y 30°C, hay especies que pueden tolerar temperaturas de 41°C como el caso de *Trichoderma saturnisporum* (Méndez y Reyes, 2009).

▪ ***Trichoderma saturnisporum* y *aggressivum***

La especie “*aggressivum*” es una forma biológica dentro del género *Trichoderma harzianum*. La *T. Harzianum* presenta cuatro formas biológicas: Th1, Th2, Th3, Th4. Siendo Th4 conocido como el biotipo agresivo el cual cambió de nombre a *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* siendo esta especie el agente causal del moho verde de los champiñones (Seaby, 1996; Chen, et al., 1999; Hermosa et ál., 2000; Castle et ál., 1998; Doyle, 1991 citado en Arenas et al., 2009). En Europa se encuentra la especie *Trichoderma aggressivum f. europaeum*, siendo el biotipo Th2, la cual es considerada no-agresiva de la *T. Harzianum* (Williams et al. 2003).

La especie *saturnisporum* fue considerada primeramente una sección dentro del género *Trichoderma*, se dividieron 5 secciones: Sección *Trichoderma*, Sección *Longibrachiatum*, Sección *Saturnisporum*, Sección *Pachybasium* y sección *Hypocreanum* (Bissett, 1991). La sección *Saturnisporum* y *Longibrachiatum* se unificaron posteriormente, debido a que la sección *saturnisporum* presenta una similitud interespecífica con las cepas de *Longibrachiatum* y se agruparon bien con este último. Por lo tanto, ambas especies de la sección *Saturnisporum* (*T. saturnisporum* y *T. ghanense*) se colocan junto con la sección *Longibrachiatum* (Singh et al., 2017).

Se descubrió hace pocos años una nueva cepa antagonista de la especie *Trichoderma saturnisporum* denominada Ca1606, la cual es eficaz en el control biológico de plagas y para la descomposición de materia orgánica, pudiendo ser aplicada en cualquier medio y ambiente en condiciones adecuadas. Tanto las conidias, clamidosporas o segmentos de hifas sirven como métodos de aplicación de esta especie (Diáñez et al., 2016).

➤ ***Cladosporium* sp.**

Los hongos del género *Cladosporium*, pertenecen a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, familia Dematiaceae. Del género *Cladosporium*, existen más de 500 especies y su traducción del griego significa “esporas

encadenadas en forma de rama” (Payam y Ramanathan, 2004; Abbott, 2002, citado en Alonso, 2012). Son hongos saprofitos de plantas en descomposición, sus esporas son de color hiliario a marrón amarillento, con un tamaño de 4 μm de ancho y 10 μm de longitud con forma elipsoidal. Producen conidióforos verticales y sus conidios son de color marrón lo que le da un aspecto aterciopelado oscuro, suelen germinar a humedades ambientales altas (Agrios, 2005). Puede crecer en un rango amplio de temperaturas desde los -6°C hasta los 28°C , ciertas especies soportan sequedad elevada en el ambiente, pero generalmente necesita una humedad relativa superior al 80% para crecer. Además las esporas pueden ser transportadas a grandes distancias durante periodos largos de tiempo y se transporta junto a partículas de polvo (Nielsen, 2003; Górnny, 2004, citado en Alonso, 2012).

Una especie destacada es *Passalora fulva* (Cooke) la cual produce la enfermedad denominada cladosporiosis en tomate, la cual ocasiona manchas marrones de micelio de color gris pálido, provocando la marchitez de la hoja.

➤ ***Penicillium sp.***

Fue descrito por primera vez por Link en 1809. Este hongo se caracteriza por ser saprófito de materia orgánica en descomposición, con una amplia distribución a nivel mundial. Son mohos comunes que se encuentran en diferentes sustratos como paja, frutas, etc (Pitt y Leistner 1991). *Penicillium sp* se considera un hongo patógeno de verduras frescas, frutas y cereales (Pitt y Hocking, 1997). Puede ser tanto colonizador en campo como de almacenamiento de alimentos. Tiene numerosas aplicaciones desde su uso en la producción de penicilina, como en la elaboración de quesos roquefort (*P. roqueforti*) y quesos azules, utilización en derivados cárnicos, fermento natural, la obtención de enzimas (pectinasas, glucosa oxidada y catalasa), utilización como fármacos. Las especies comunes más conocidas del género *Penicillium sp* son: *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium marneffe* y *Penicillium purpurogenum*. (Beuchat, 1987; Pitt, 1979; Bryan, et al., 1949, citado en Martínez Benítez, 2004).

En cuanto a su morfología se caracteriza por presentar una estructura en forma de pincel, (*Penicillus*, significa en latín “pincel pequeño”), al estar formada por conidios en forma ramificada, en su terminación se encuentran células conidiógenas llamadas fiálides, formando verticilos. Presentan uno, dos o incluso 3 puntos de ramificación, denominándose métula a la célula que soporta a la fiálide y la que soporta a la métula se denomina rama. Las ramas se originan de la estipe o a veces de otras ramas. Las paredes de las ramificaciones pueden ser lisas, rugosas o equinuladas, mientras que los conidios son esféricos o elipsoidales y en gran cantidad se ven de color verde, verde azulado o gris (Webster, 2007 y Martínez Benítez, 2004).

El género *Penicillium sp* se divide en cuatro subgéneros según la morfología del conidióforo y velocidad de crecimiento (Bridge et al., 1992; Pitt y Hocking, 1997; Martínez Benítez, 2004):

- **Monoverticiliado**: cuando el conidióforo es simple, con una única ramificación desde el conidio a la estipe y este pertenece al subgénero *Aspergilloides* y *Monoverticillata*.
- **Terverticiliado o cuaterverticiliado**: es el conidióforo más complejo, presentando todas las ramificaciones: fiálides, rama, estipe y métula. Pertenece al género *Penicillium* y son de crecimiento rápido.

- **Biverticiliados:** Presentan 2 ramificaciones la fiálida y la métula. Pertenecen al género *Biverticillium* y *Furcatum*, de crecimiento más lento.

Dentro de las diferentes especies de *Penicillium sp* su crecimiento depende de dos variables: la temperatura y actividad del agua a_w (en una forma disponible para poder crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas)

ESPECIES	TEMPERATURA °C		ACTIVIDAD DEL AGUA a_w	
	RANGO	ÓPTIMO	MÍNIMA	ÓPTIMA
<i>P. aurantiogriseum</i>	-2 - 32	23	0,81 - 0,83	0,98
<i>P. brevicompactum</i>	12 - 30	23	0,80 - 0,82	0,99
<i>P. citrinum</i>	<5 - 37	26-30	0,80 - 0,84	
<i>P. commune</i>	0 - 37	25	0,85	
<i>P. digitatum</i>	6 - 37	20-25	0,90	0,99
<i>P. expansum</i>	-3 - 35	25-26	0,82 - 0,83	0,99
<i>P. islandicum</i>	10 - 42	31	0,83 - 0,86	
<i>P. roquefortii</i>	<5 - 35	25	0,83	0,99
<i>P. verrucosum</i>	0 - 31	20	0,80	

Tabla 2: Temperatura y actividad del agua necesarias para el crecimiento de algunas especies de *Penicillium* (Corry, 1987, Lacey 1989, citado en Carrillo, 2003).

2.-Fases de la realización y su cronograma asociado

2.1.-Fases:

Este estudio se dividirá en las siguientes fases:

1. Preparación de las esporas necesarias para la inoculación sobre los diferentes pulgones.
2. Preparación de los recipientes donde se llevó a cabo el estudio.
3. Obtención de las diferentes especies de pulgón y hongos.
4. Inoculación de las esporas por pulverización sobre las distintas poblaciones.
5. Toma de datos, anotando los pulgones muertos en cada día.
6. Finalización con la mortalidad total de los áfidos.
7. Comprobación del parasitismo.
8. Finalización del ensayo.

Los pulgones se obtendrán del invernadero experimental de la Universidad de Almería, mientras que los hongos se obtendrán de la colección de Fitopatología del departamento de Agronomía.

Todo el trabajo se realizará en las instalaciones de la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad de Almería.

2.2.-Cronograma asociado:

Desarrollo en días del ensayo:

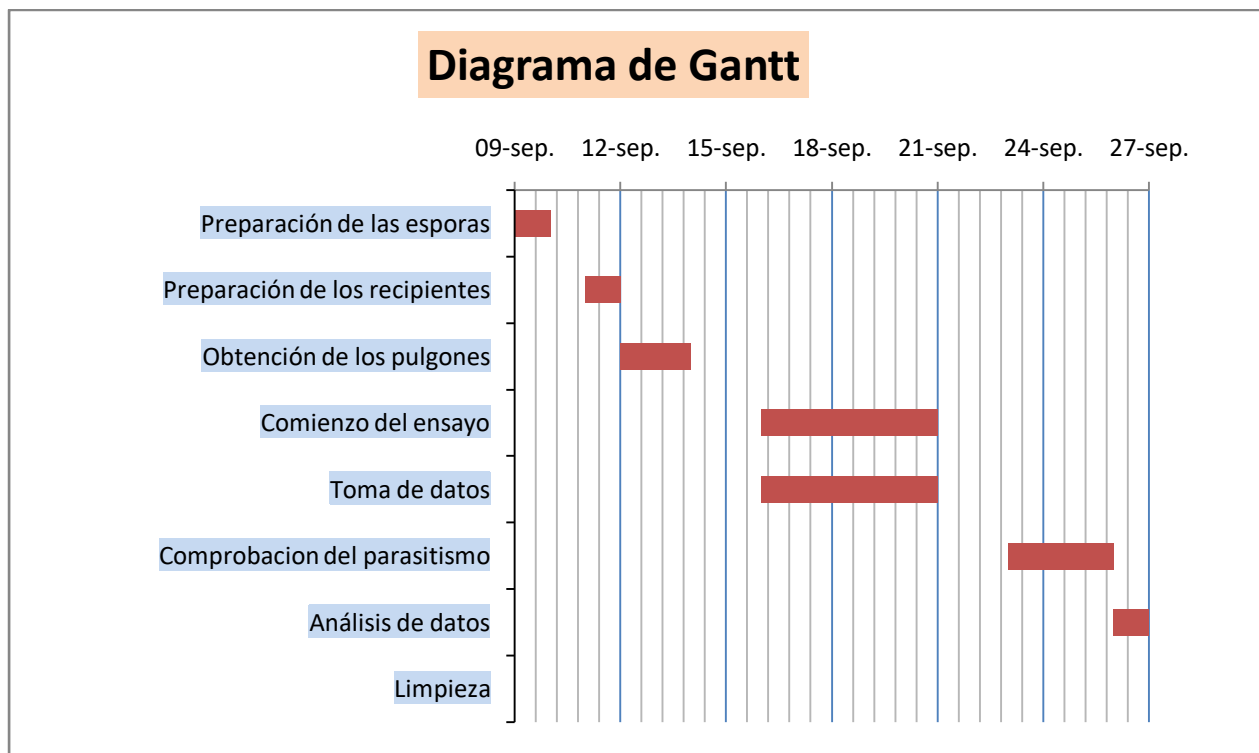


Figura 1: Diagrama de Gantt

3.-Competencias de la titulación integradas en el desarrollo del proyecto

- **E-CA04** - Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de: Aplicaciones de la biotecnología en la ingeniería agrícola y ganadera.

Se llevó a cabo la utilización de cepas de hongos entomopatógenos para obtener un producto biológico eficaz y respetuoso con el medio ambiente, para el control de plagas en este caso sería para el control de pulgones.

- **E-TFG** - Capacidad para realizar un ejercicio original individualmente y presentar y defender el mismo ante un tribunal universitario.

La realización de este documento me ha permitido desarrollar un proyecto original para su posterior defensa en un tribunal. Lo que me ha otorgado nuevos conocimientos sobre la materia de investigación.

- **CTH01** - Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de: Tecnología de la Producción Hortofrutícola: Bases y tecnología de la propagación y producción hortícola, frutícola y ornamental. Control de calidad de productos hortofrutícolas. Comercialización. Genética y mejora vegetal.

Este ensayo me ha permitido el desarrollo y evaluación de un posible nuevo producto fitosanitario para la agricultura tanto frutícola, hortícola y ornamental con residuo cero.

- **CTE02** - Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de: Tecnologías de la producción vegetal: Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de: Sistemas de producción y explotación. Protección de cultivos contra plagas y enfermedades. Tecnología y sistemas de cultivo de especies herbáceas. Agroenergética

Se adquirieron habilidades y conocimientos sobre la protección de cultivos contra plagas como la utilizada en este ensayo. Reconociendo su forma de propagación, reproducción y crecimiento como sus daños producidos en el cultivo.

4.-Especificaciones y requerimientos técnicos.

4.1.- Ubicación de los Áfidos.

Los cultivos de pulgones (*Aphis gossypii*, *Melanaphis sacchari*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*) fueron obtenidos de poblaciones de campo que infestaban a diferentes cultivos.

- *Aphis gossypii* proviene de una población que infestaba a *Vitis vinifera*, situada en el invernadero experimental de la Universidad de Almería.



Imagen 8: Pámpano de *Vitis vinifera* con población de *Aphis gossypii* en invernadero experimental de la Universidad de Almería

- *Melanaphis sacchari* esta especie de pulgón proviene de una población que infestaba *Nerium oleander*, situada en el perímetro del invernadero experimental de la Universidad de Almería.



Imagen 9: Brote tierno de *Nerium oleander* con población de *Melanaphis sacchari*.

- *Myzus persicae* fue obtenida de una población de campo que colonizaba *Capsicum annuum*, situada el invernadero experimental de la Universidad de Almería.



Imagen 10: Colonia de *Myzus persicae* alimentándose en hoja de *Capsicum annuum*.

- *Rhopalosiphum padi* proviene de una planta bunker de *Hordeum vulgare*, utilizada en los invernaderos de Almería.



Imagen 11: Planta bunker de *Hordeum vulgare* con una colonia de *Rhopalosiphum padi*.

4.2.- Material fúngico

Los hongos entomopatógenos de cultivos puros se obtendrán de la colección de Fitopatología del departamento de Agronomía de la Universidad de Almería.

Siendo los hongos utilizados:

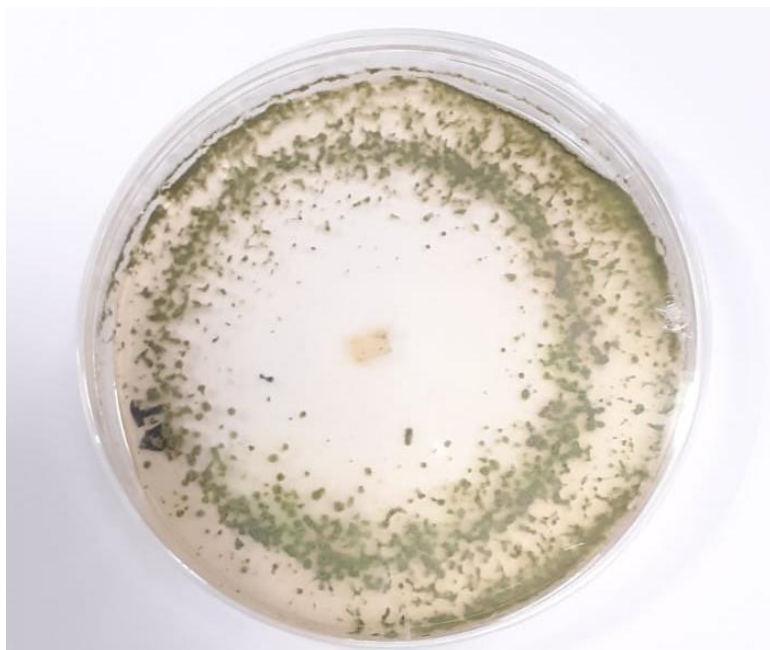


Imagen 12: *Trichoderma aggressivum* nombrada en el ensayo como TA.



Imagen 13: *Trichoderma saturnisporum* nombrada en el ensayo como TS.



Imagen 14: *Cladosporium* sp denominada en el ensayo Cl.

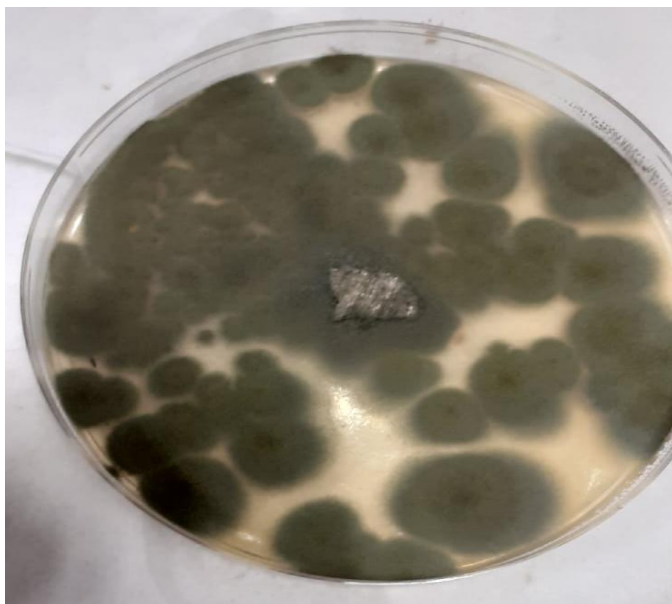


Imagen 15: *Penicillium sp* nombrado en el ensayo como CONT.

Una vez obtenido el material fúngico previamente aislado en un medio artificial PDA, creciendo 7 días a 25°C, libre de contaminantes y tener buen desarrollo se lleva a cabo la obtención de esporas.

4.3.- Extracción de esporas y conteo de esporas.

Para realizar una pulverización adecuada de esporas, en primer lugar se realiza un conteo exacto de esporas, para estimar un número igualitario en cada pulverización.

1. Se vierte 10 ml agua estéril y unas gotas de polisorbato 20 (Tween 20) en placa de Petri.



Imagen 16: Vertido de agua estéril a placa Petri.

2. Se raspa suavemente la superficie de la placa Petri con una varilla de vidrio, para facilitar que las esporas o conidias se suelten más fácilmente. Se mantiene el mechero Bunsen encendido para evitar la contaminación de la placa Petri y la desinfección continua del material utilizado como pinzas y punzones mediante alcohol.



Imagen 17: Raspado de superficie de la placa Petri con una varilla de vidrio.

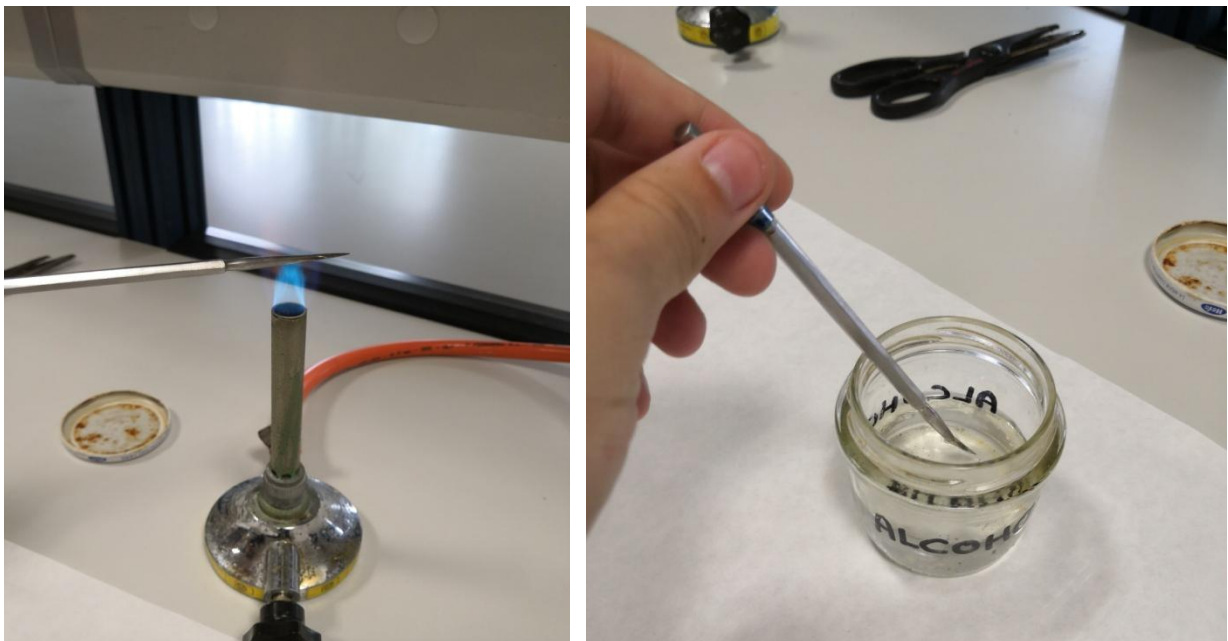


Imagen 18: Mechero Bunsen para la desinfección del material utilizado.

3. Una vez que comprobemos que los conidios se han desagregado y disueltos en el agua estéril procederemos a su vertido en un recipiente. Posteriormente lo agitaremos durante unos minutos para su dilución correcta.



Imagen 19: Recipiente con concentración de esporas.

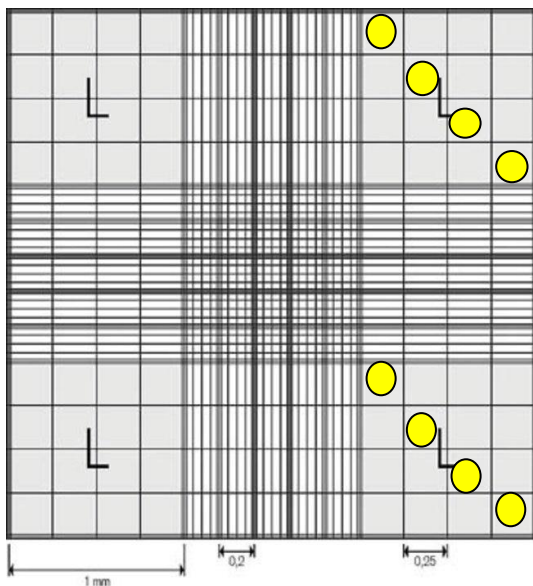


Imagen 20: Agitador de esporas.

4. Preparación de la cámara Neubauer o hemocitómetro.

Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula, correspondiente a un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Se utiliza para el recuento de esporas en un medio líquido.

En la cámara Neubauer se coloca un cubreobjetos que se adhiere por tensión superficial, una vez que hayamos diluido la solución de esporas en agua estéril, para que sea más fácil el conteo de esporas. 100 μl de esporas / 1000 μl de agua destilada. Posteriormente con una micropipeta se introduce la disolución diluida por debajo del cubreobjetos.



El hemocitómetro está formado por 9 cuadrados grandes con una superficie de 1mm^2 .

Los 4 cuadrados grandes de las esquinas señalados con una "L" están divididos en 16 cuadrados con aristas de 0,25 mm.

Una vez introducida la solución diluida en el hemocitómetro se observa al microscopio (x20 de aumentos) y se cuentan las esporas. Las esporas se cuentan en 4 cuadrados en diagonal de 2 esquinas "L" un total de 8 cuadrados.

Imagen 21: Hemocitómetro al microscopio.

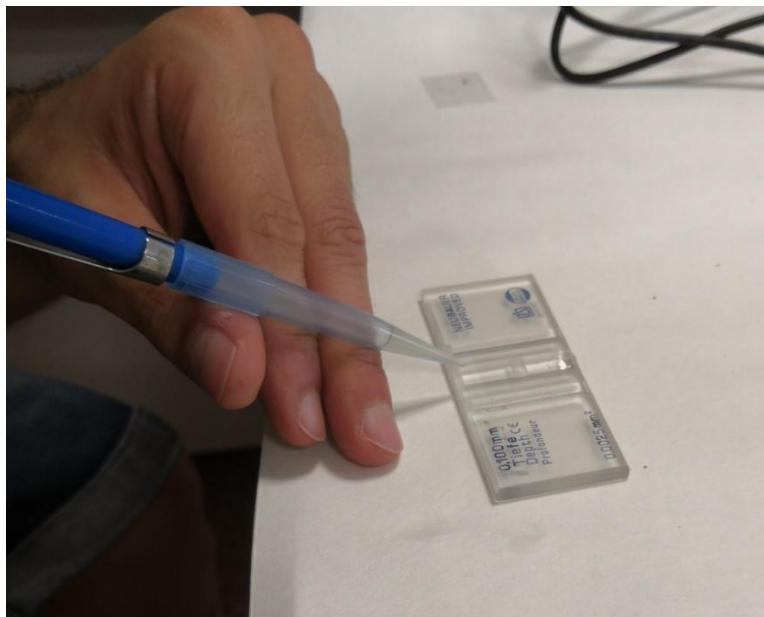


Imagen 22: Introducción de la concentración de esporas diluidas mediante una micropipeta. 100 μl de esporas / 1000 μl de agua destilada.

5. Conteo de esporas.

Mediante la fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de esporas} = X \times 16 \times \text{ID} \times 10^4$$

X= media de las conidias contadas

ID= Factor de disolución, inversa a la disolución empleada.

La concentración final de esporas por cada repetición será de $1,5 \times 10^7$ de esporas por mL.

4.4.-Preparacion del ensayo

Una vez preparadas las esporas para su pulverización, se llevó a cabo la preparación de las diferentes especies de pulgón en sus respectivos recipientes para llevar a cabo el ensayo. Se realizó lo siguiente:

❖ Preparación de los recipientes:

Se prepararon un total de 20 recipientes, 4 para cada especie de pulgón y un T0 para comprobar su eficacia.

Los recipientes utilizados fueron modificados para poder realizar el estudio, se le realizó a cada recipiente un orificio en la parte baja y se colocó una malla, para la respiración de los áfidos. Luego a cada recipiente fue nombrado con la abreviatura de cada hongo.

TS - *Trichoderma saturnisporum*

TA - *Trichoderma aggressivum*

CL - *Cladosporium sp.*

CONT - *Penicillium sp*

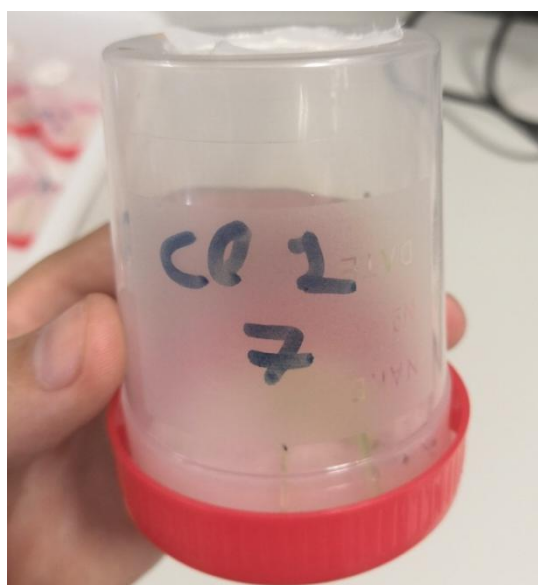


Imagen 23: Recipientes modificados y recipiente nombrado.

Seguidamente a la fabricación y nombrado de los recipientes, se llevó a cabo su desinfección mediante hipoclorito de sodio 5%, durante 5 min y su posterior lavado con agua estéril durante otros 5 minutos, para reducir la cantidad de hipoclorito de sodio.



Imagen 24: Recipientes desinfectados con hipoclorito de sodio 5%.

❖ Colocación de algodones, material vegetal y áfidos:

Una vez preparados los recipientes, se llevó a cabo la introducción de algodones esterilizados, para favorecer el clima dentro de los recipientes y facilitar la localización de los áfidos.

Los algodones fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 120°C, además de su sumersión en agua estéril durante unos segundos, para su humectación y su posterior secado.



Imagen 25: Paquete de algodones esterilizados en autoclave.

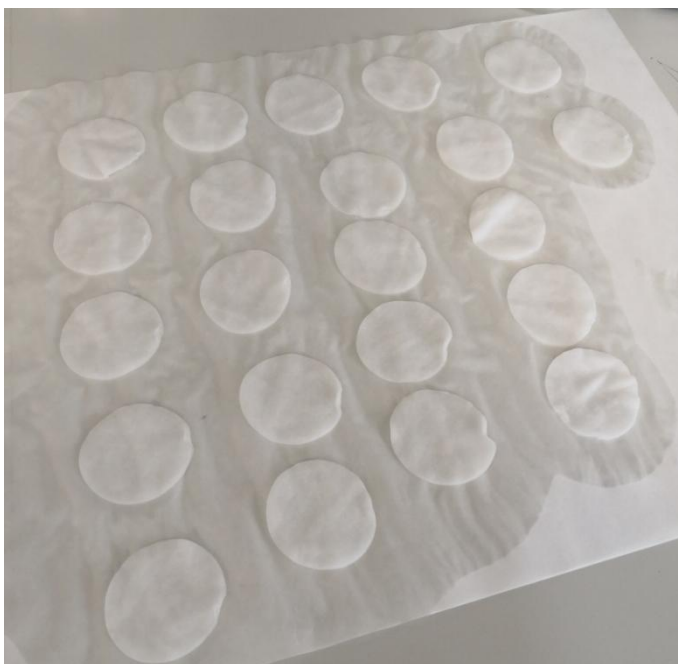


Imagen 26: Humectación de los algodones y su posterior secado.

Después se introdujeron los algodones en los recipientes con la intención de mantener la humedad durante el ensayo.

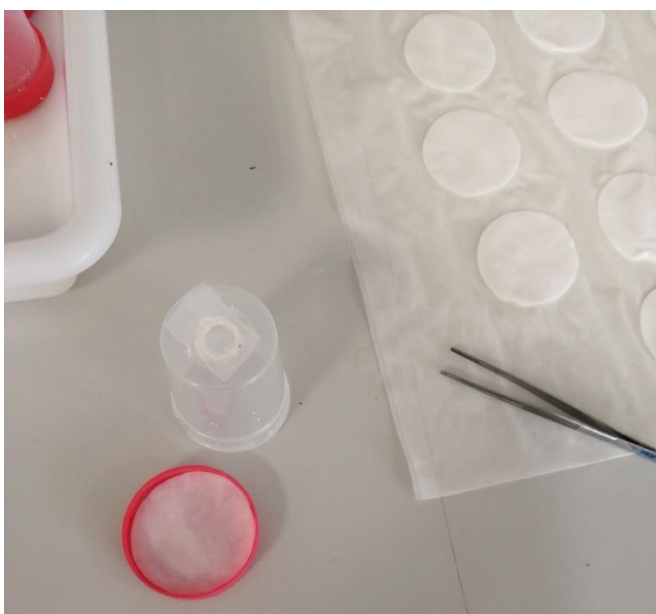


Imagen 27: Introducción de los algodones en los recipientes mediante unas pinzas desinfectadas.

Posteriormente se preparó el material vegetal fresco, cortándolo en fragmentos pequeños para facilitar la introducción en cada recipiente, siendo cada material vegetal diferente para cada especie de pulgón utilizada.

El material vegetal fue esterilizado de la siguiente manera: 5 minutos con hipoclorito de sodio al 5%, luego 5 min en agua estéril y para finalizar otros 5 min en agua estéril. Con esta doble desinfección en agua esterilizada evitaremos una posible intoxicación de los áfidos como consecuencia del hipoclorito sódico. Una vez terminada la desinfección, el material vegetal se seca en papel de filtro.

Para cada especie de pulgón vamos a utilizar un material vegetal diferente:

- ✓ *Aphis gossypii* se usó material vegetal de *Vitis vinífera*.
- ✓ *Melanaphis sacchari* se utilizó material vegetal de *Nerium oleander*.
- ✓ *Myzus persicae* se utilizó material de *Capsicum annuum*.
- ✓ *Rhopalosiphum padi* se empleó material de *Hordeum vulgare*.



Imagen 28: Material de *Nerium oleander* cortado en fragmentos pequeños.

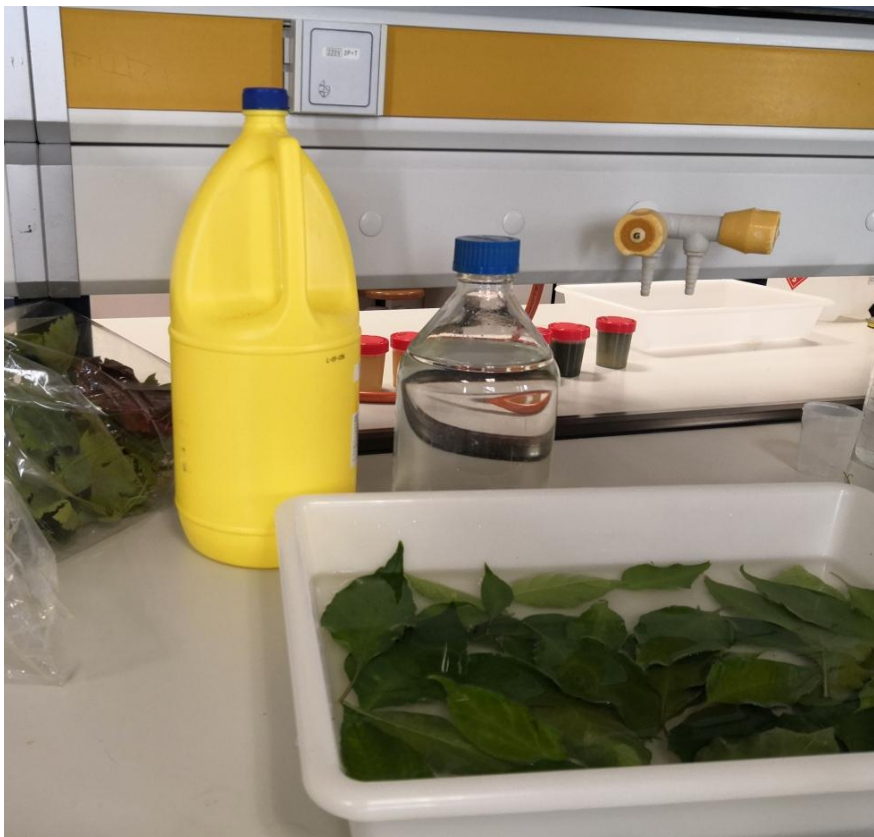


Imagen 29: Desinfección del material vegetal de *Capsicum annuum* mediante agua esterilizada e hipoclorito de sodio al 5%.



Imagen 30: Secado de material vegetal *Vitis vinifera* en papel de filtro.

Posteriormente a la esterilización del material vegetal, se insertaron los diferentes fragmentos en los recipientes, sobre los algodones anteriormente introducidos.



Imagen 31: Fragmentos de *Hordeum vulgare* colocados sobre algodón esterilizado en un recipiente.

A continuación se introdujeron las especies de áfidos, introduciendo por cada recipiente 10 pulgones para las especies: *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* y *Melanaphis sacchari*. Y 15 pulgones para la especie: *Rhopalosiphum padi*.



Imagen 32: Pulgones de la especie *Rhopalosiphum padi* en material vegetal de *Hordeum vulgare* en su respectivo recipiente.



Imagen 33: Pulgones de la especie *Melanaphis sacchari* en material vegetal de *Nerium oleander* en su respectivo recipiente.



Imagen 34: Pulgones de la especie *Aphis gossypii* en material vegetal de *Vitis vinifera* en su respectivo recipiente.



Imagen 35: Pulgones de la especie *Myzus persicae* en material vegetal de *Capsicum annuum* en su respectivo recipiente.

Justo después de la preparación de los recipientes del ensayo con las diferentes especies de pulgón en su interior, se realizó la pulverización del material fúngico, para su posterior estudio.

4.5.-Pulverización

La pulverización de las esporas obtenidas del material fúngico fue aplicada mediante un pulverizador en una campana de extracción, siendo la concentración $1,5 \times 10^7$ de esporas por cada repetición por ml. Para cada especie de hongo se realizaron 4 repeticiones y su respectivo T0. El T0 se pulverizó con agua estéril.

A continuación de la pulverización, se insertaron los pulgones con su tratamiento ya aplicado en una estufa la cual presenta unas condiciones de temperatura de 25°C constantes y un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 de oscuridad. Con estas condiciones se consigue unas condiciones óptimas para el desarrollo de los pulgones y hongos.

Posteriormente a la pulverización se efectuó un recuento de los áfidos cada día, anotando los áfidos muertos y su total.



Imagen 36: Pulverización de los hongos entomopatógenos en la campana de extracción mediante un pulverizador.



Imagen 37: Estufa.

4.6.- Parasitismo.

Una vez obtenidos los datos del ensayo referidos a la mortalidad que produce los hongos en los diferentes pulgones, se comprobó si los hongos parasitaron solo la cutícula o fueron capaces de introducirse en el interior del organismo de los áfidos.

Esto se efectuó justo después de la mortalidad de todos los pulgones. Se dejaron los recipientes con su cámara húmeda para favorecer el desarrollo de los hongos y su crecimiento de micelio. Después para comprobar si solo se desarrolló el hongo en la cutícula o también en su interior, se utilizaron los pulgones con mayor desarrollo de micelio. Se dividió en 2 procesos:

- ✓ Cutícula: Se introdujeron los pulgones en un medio PDA directamente y se dejaron crecer durante unos días en condiciones óptimas.
- ✓ Interior organismo: En primer lugar se sumergieron los pulgones con mayor cantidad de micelio en alcohol durante 5 minutos, una vez pasado ese tiempo se introdujeron en agua destilada durante otros 5 minutos, repitiendo una vez pasado este tiempo otros 5 minutos en agua destilada. Teniendo ya los áfidos desinfectados se dejaron secar en condiciones ambiente y se colocaron en un medio PDA. Posteriormente se dejaron crecer los hongos durante unos días en condiciones óptimas.

5.-Resultados y discusión.

La representación de los resultados se reflejan en 2 gráficas:

- ❖ Porcentaje mortalidad medio:

$$\% \text{ Mortalidad} = 1 - \left[\frac{\text{Individuos vivos} - \text{Individuos muertos}}{\text{Individuos vivos}} \right] 100$$

También se calcula el LT50 de los tratamientos para determinar el tiempo que tarda en alcanzar el 50% de mortalidad cada hongo entomopatógeno.

En cada grafica está calculado en cuanto tiempo (Días) cada tratamiento llega al 50% de mortalidad.

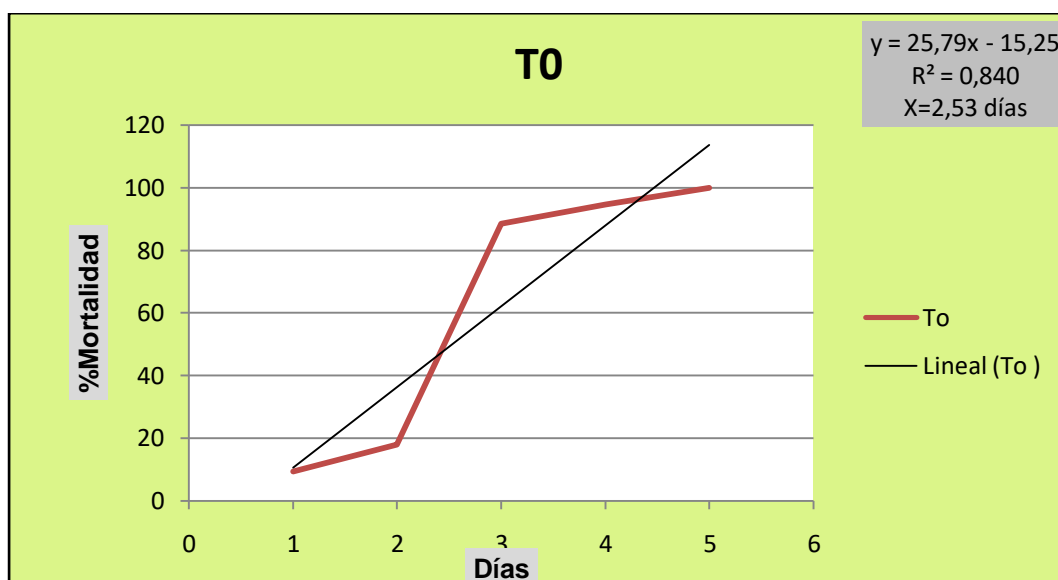
- ❖ Porcentaje de mortalidad corregido Abbot (Abbott, 1925):

$$\% \text{ Mortalidad corregida} = \frac{\% \text{ mortalidad muestra} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}} 100$$

Las gráficas representan el porcentaje de mortalidad respecto a los días.

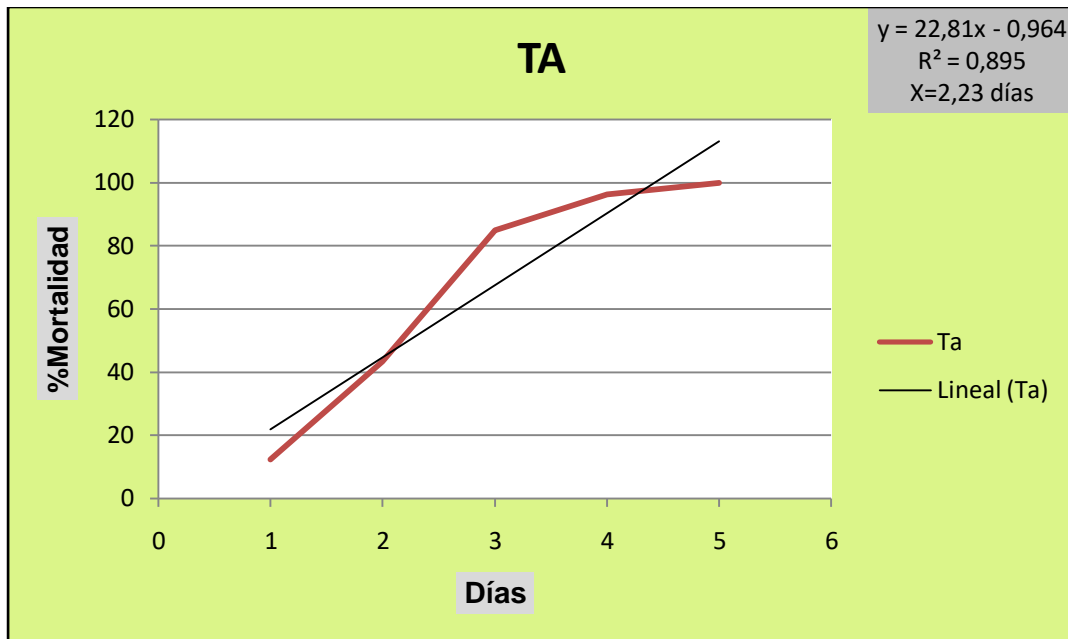
5.1.-Gráficas de *Aphis gossypii*

5.1.1.-Gráficas de mortalidad medio



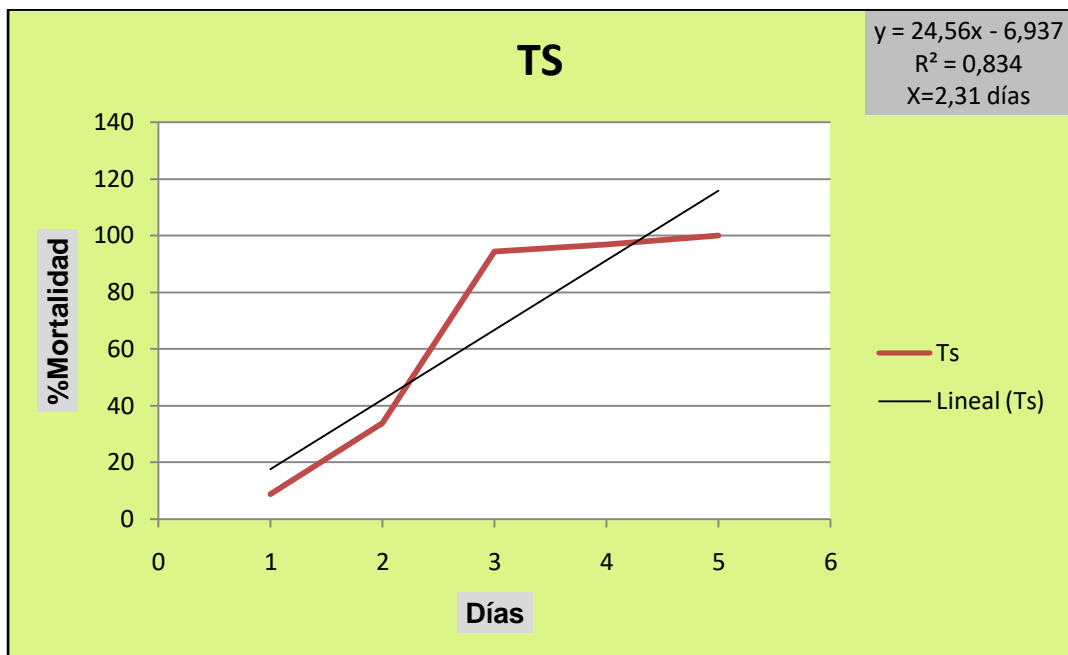
Gráfica 1: Porcentaje de mortalidad medio de T0 (control).

T0 presenta una mortalidad del 50% a los 2,53 días. Esto nos permitirá tener una perspectiva de los hongos entomopatógenos más eficaces a mitad del tratamiento. Siendo los más eficaces aquellos que obtengan la mitad de mortalidad antes de 2,53 días.



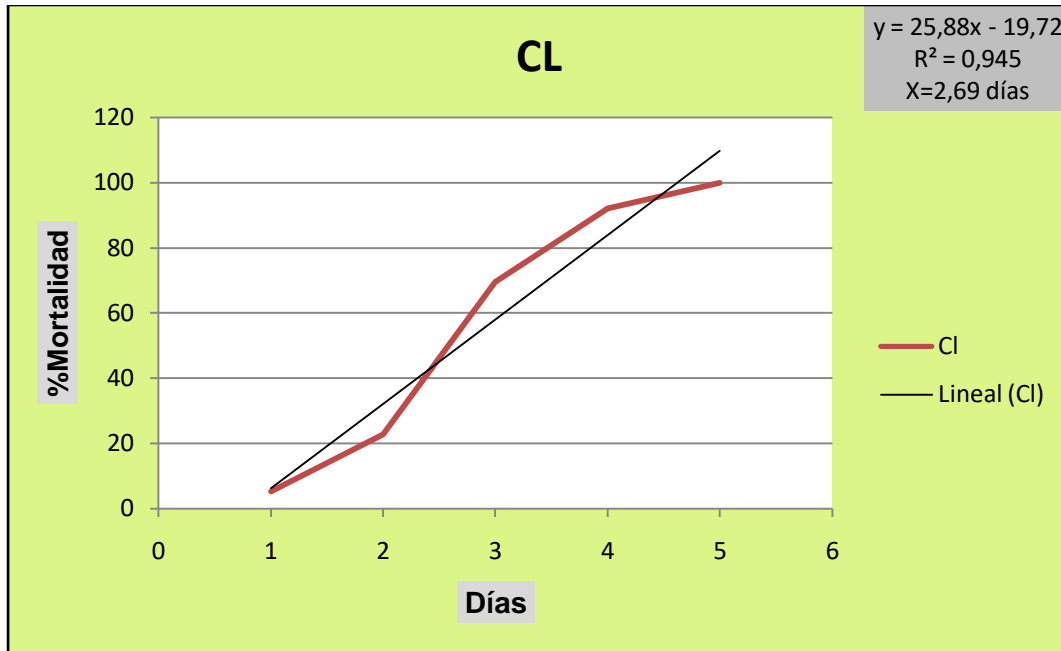
Gráfica 2: Porcentaje de mortalidad medio de *Trichoderma aggressivum*.

Trichoderma aggressivum presenta una mortalidad del 50% a los 2,23 días. Mejorando la eficacia en mortalidad que T0, obteniendo unos datos a mitad del tratamiento bastantes óptimos.



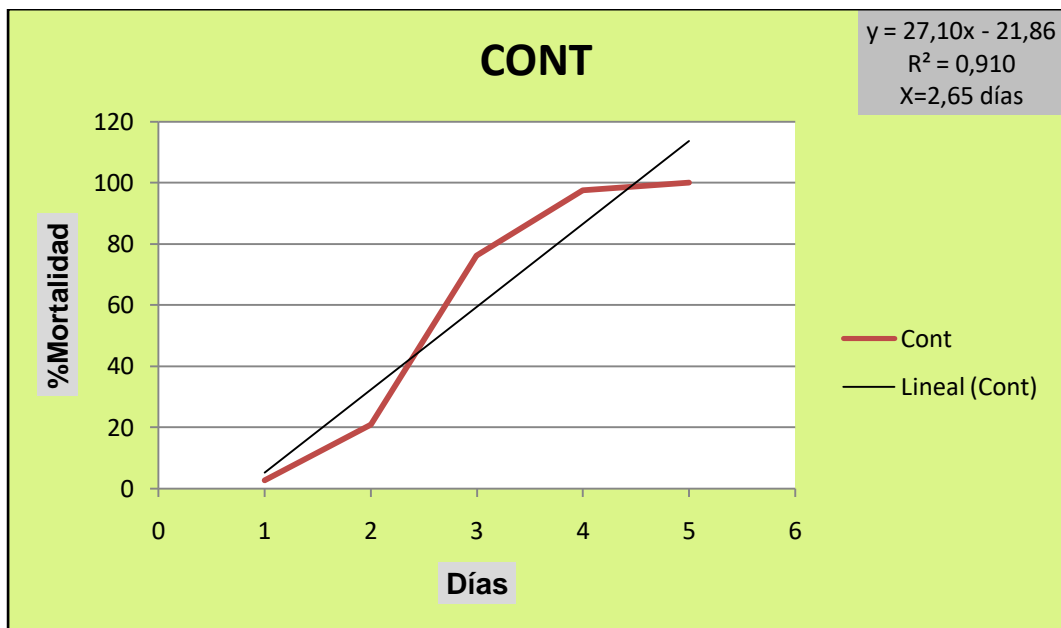
Gráfica 3: Porcentaje de mortalidad medio de *Trichoderma saturnisporum*.

Trichoderma saturnisporum obtiene un 50% de mortalidad a los 2,31 días, un dato mejor que T0, aunque no supera a *Trichoderma aggressivum* en eficacia a la mortalidad media del tratamiento.



Gráfica 4: Porcentaje de mortalidad medio de *Cladosporium sp.*

La mortalidad media de *Cladosporium sp* se obtiene a los 2,69 días, unos datos peores que T0 que presenta una mortalidad media a los 2,53 días. Por tanto *Cladosporium sp* no presenta unos datos deseados.



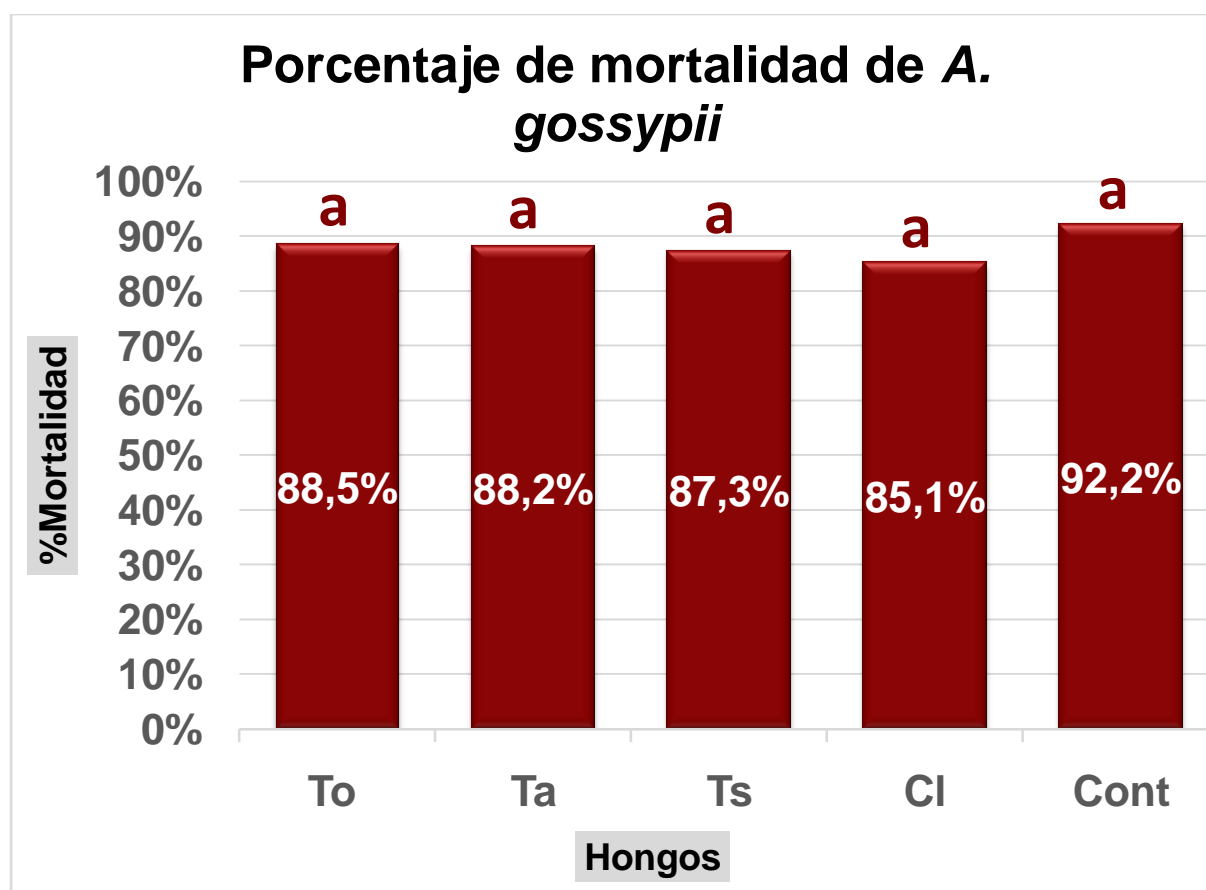
Gráfica 5: Porcentaje de mortalidad medio de *Penicillium sp.*

Penicillium sp presenta una mortalidad media a los 2,65 días. Por lo que no mejora los datos de T0 de 2,53 días, aunque si presenta una mortalidad media más elevada que *Cladosporium sp*.

Mortalidad 50%	Hongos	Días
	T0	2,53
	<i>Trichoderma aggressivum</i>	2,23
	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	2,31
	<i>Cladosporium sp.</i>	2,69
	<i>Penicillium sp.</i>	2,65

Tabla 3: Representación de **LT50** frente a *Aphis gossypii*.

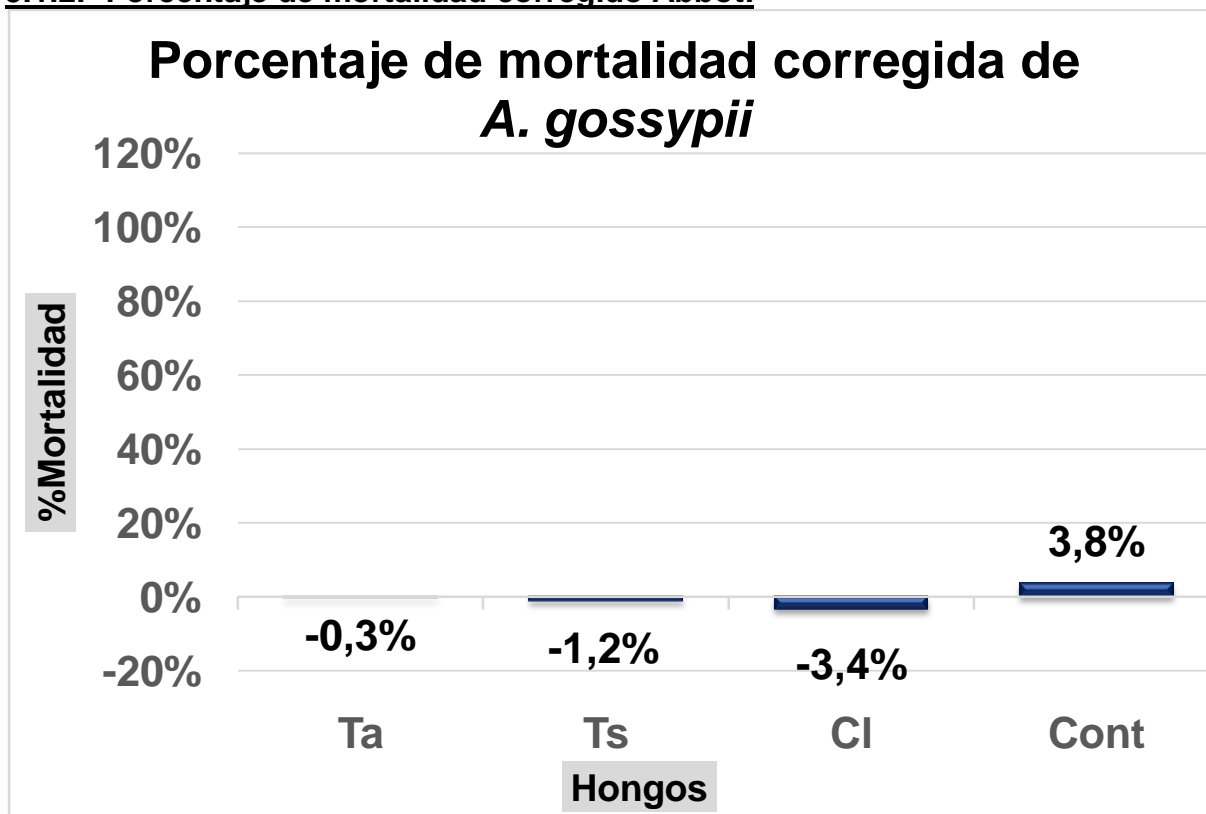
Como podemos observar T0 presenta una mortalidad del 50% a los 2,53 días, siendo solo *Trichoderma aggressivum* y *T. saturnisporum* los únicos que mejoran esos datos con 2,23 días y 2,31 días respectivamente. Tanto *Penicillium sp* y *Cladosporium sp* no han obtenido datos óptimos en este ensayo, siendo *Cladosporium sp* el que necesita un mayor tiempo en alcanzar una mortalidad del 50% en la especie *Aphis gossypii*.



Gráfica 6: Porcentaje de mortalidad medio para cada tratamiento medido a los 3 días del ensayo.

En cuanto a los resultados globales a los 3 días del tratamiento, no se obtienen datos deseados no superando ningún hongo la mortalidad que se produce en T0, excepto *Penicillium sp* pero sin diferencias significativas.

5.1.2.- Porcentaje de mortalidad corregido Abbot.

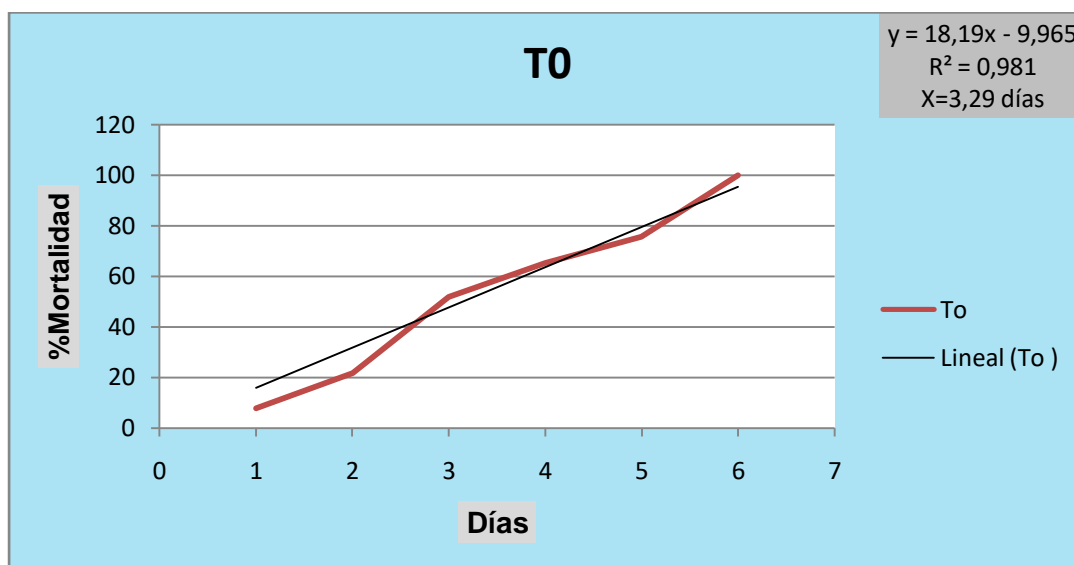


Gráfica 7: Porcentaje de mortalidad corregido que se produce a los 3 días.

Con respecto al porcentaje de mortalidad corregido como observamos en la gráfica 7, ningún hongo entomopatígeno presenta datos reveladores a los 3 días del tratamiento estando *T. aggressivum*, *T. saturnisporum* y *Cladosporium sp* por debajo del porcentaje de mortalidad corregido de T0. Sólo *Penicillium sp* los mejora pero con porcentaje muy bajo del 3,8%. Por tanto ningún hongo ha mostrado ser interesante en el control de esta especie de pulgón *Aphis gossypii*.

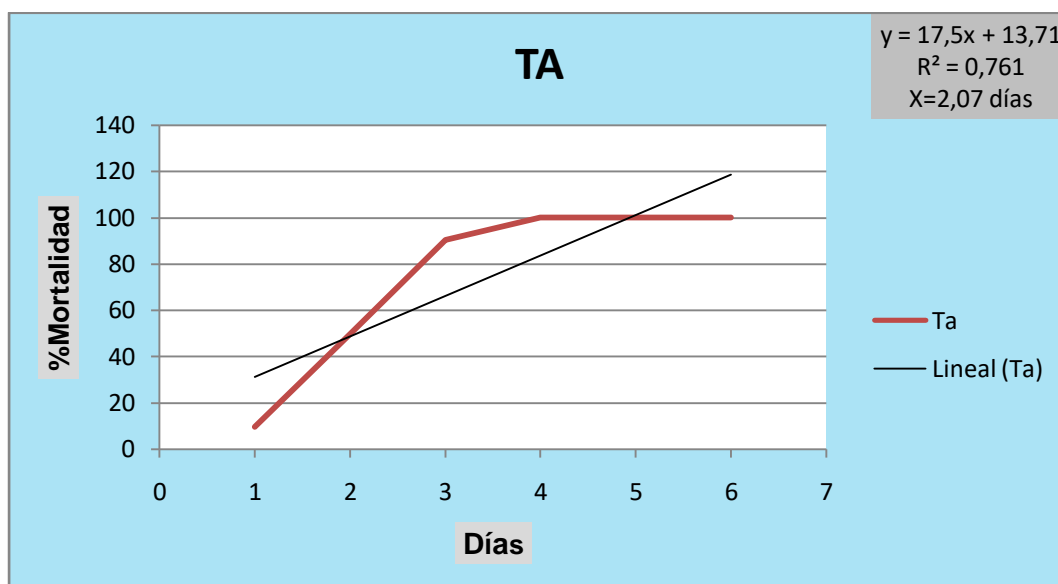
5.2.- Gráficas *Melanaphis sacchari*

5.2.1 Graficas porcentaje mortalidad medio.



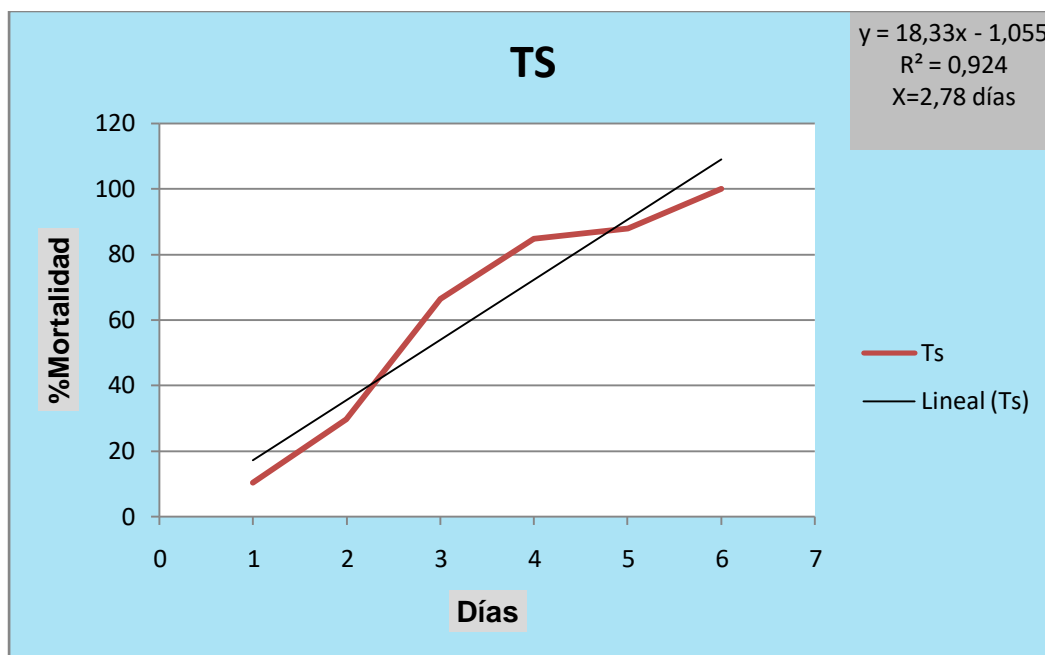
Gráfica 8: Porcentaje de mortalidad medio de **T0**.

T0 presenta una mortalidad del 50% a los 3,29 días. Esto nos permitirá tener una perspectiva de los hongos entomopatógenos más eficaces a mitad del tratamiento. Siendo los más eficaces aquellos que obtengan la mitad de mortalidad antes de 3,29 días.



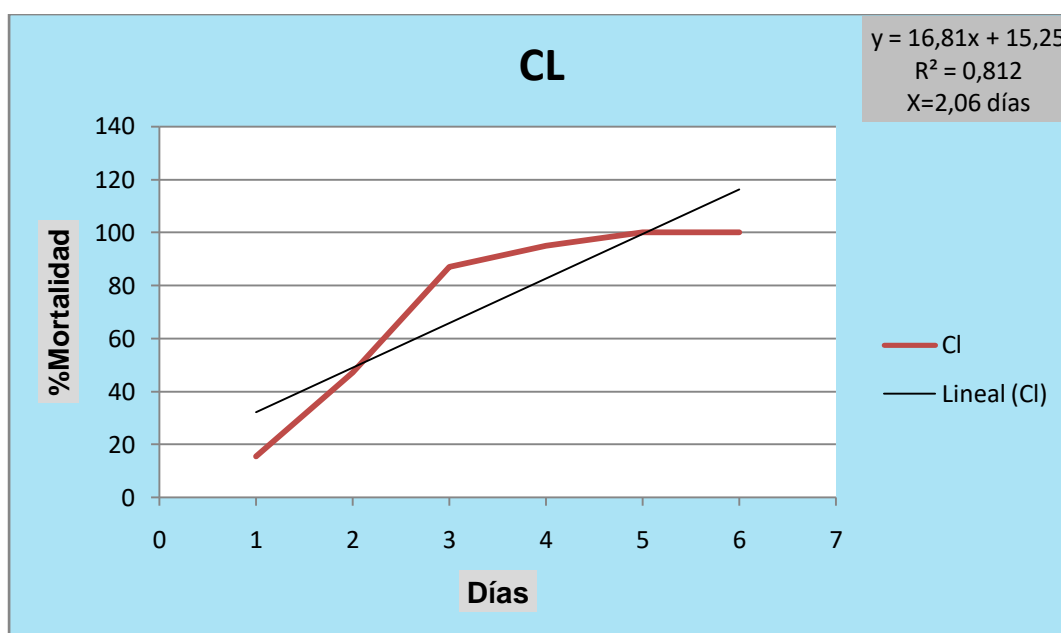
Gráfica 9: Porcentaje de mortalidad medio ***Trichoderma aggressivum***.

Trichoderma aggressivum mejora bastante los datos con respecto a T0, reduciendo el tiempo en que se alcanza la mortalidad media en más de 1 día, ya que alcanza una mortalidad del 50% a los 2,07 días, por lo que los datos son bastante óptimos.



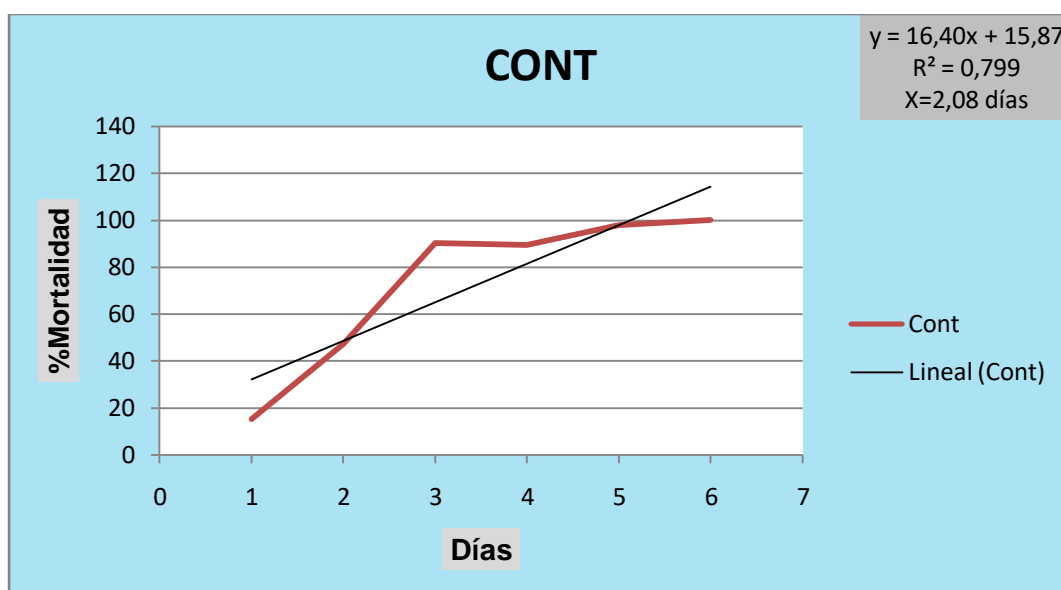
Gráfica 10: Porcentaje de mortalidad medio de *Trichoderma saturnisporum*.

La mortalidad media de *Trichoderma saturnisporum* en la especie *Melanaphis sacchari* se alcanza a los 2,78 días, un dato inferior al control T0 que lo alcanza a los 3,29 días por lo que mejora los datos. Aunque no mejora los datos de los demás hongos utilizados en el ensayo.



Gráfica 11 : Porcentaje de mortalidad medio de *Cladosporium sp.*

Cladosporium sp presenta una mortalidad del 50% a los 2,06 días, obteniendo datos notablemente deseados. Su mortalidad con respecto a *Trichoderma aggressivum* y *Penicillium sp* son prácticamente iguales.

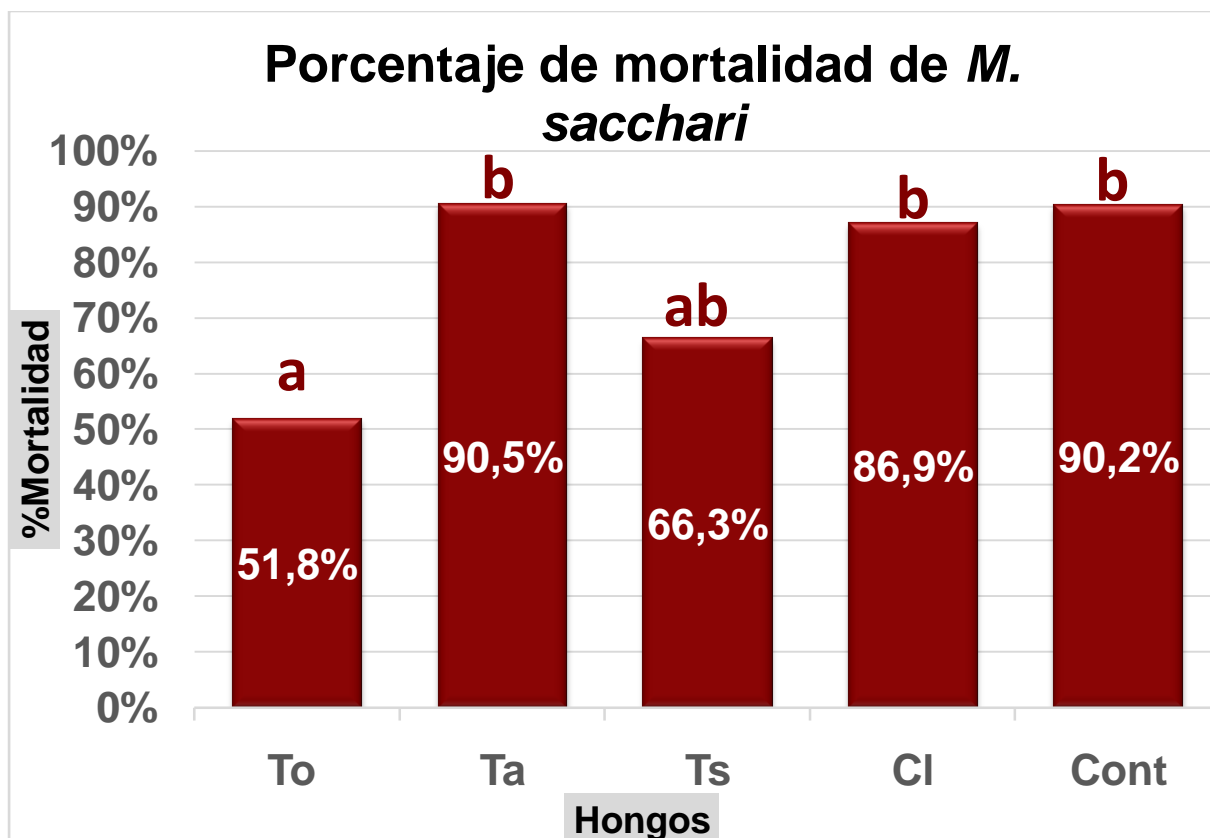


Gráfica 12: Porcentaje de mortalidad medio de *Penicillium sp.*

Mortalidad 50%	Hongos	Días
	T0	3,29
	<i>Trichoderma aggressivum</i>	2,07
	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	2,78
	<i>Cladosporium sp.</i>	2,06
	<i>Penicillium sp.</i>	2,08

Tabla 4: Representación de **LT50** frente a *Melanaphis sacchari*.

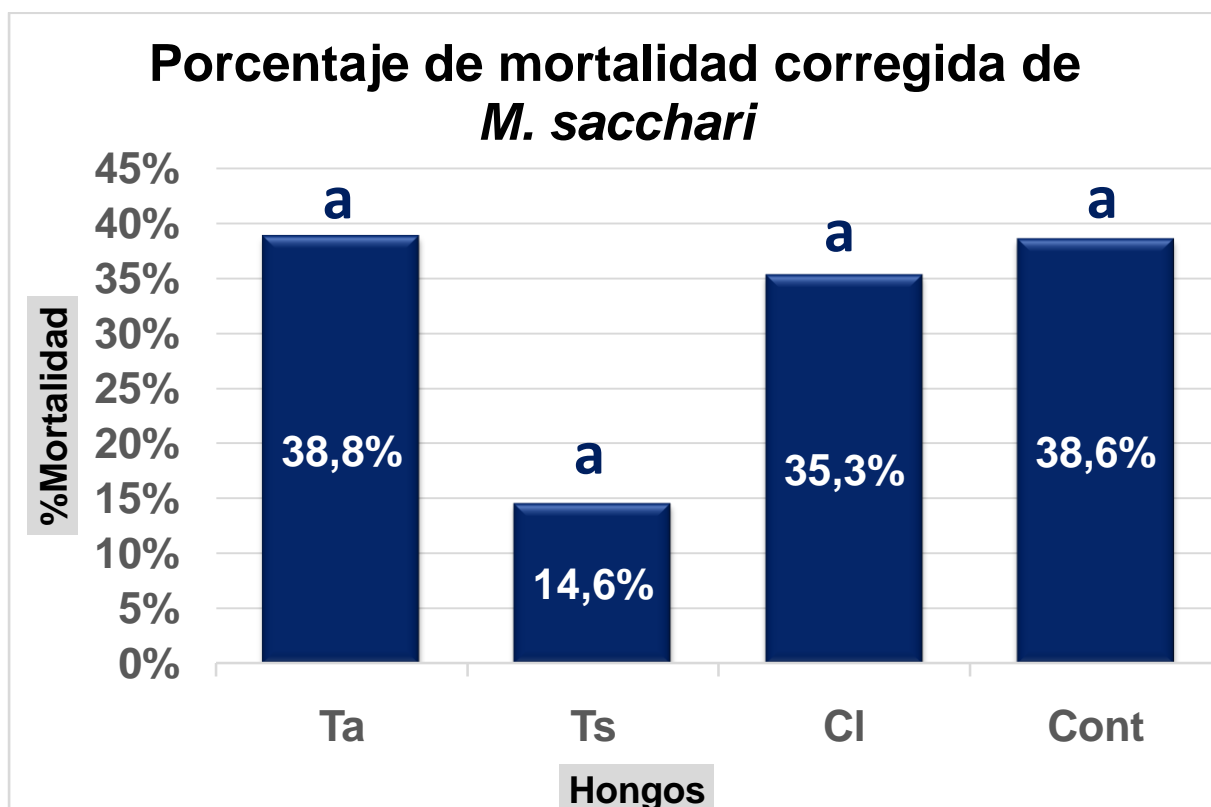
Como refleja la tabla 4, tanto *Trichoderma aggressivum*, *Cladosporium sp* y *Penicillium sp* exhiben un LT50 casi idéntico, estos datos muestran unos datos muy óptimos. Por otro lado tenemos *Trichoderma saturnisporum* que muestra un porcentaje medio de mortalidad mejor que T0, aunque es el hongo que necesita más tiempo en alcanzar el LT50.



Gráfica 13: Porcentaje de mortalidad medio para cada tratamiento medido a los 3 días del ensayo.

Como vemos en la gráfica 13, *Trichoderma aggressivum* presenta el mejor porcentaje de mortalidad, alcanzando el 90,5% al tercer día, aunque tanto *Cladosporium sp* y *Penicillium sp* presentan porcentajes muy parecidos a *T. aggressivum* de mortalidad a los 3 días de tratamiento. Sin embargo, el 50% de la mortalidad es alcanzado tanto en *Trichoderma aggressivum*, *Cladosporium sp* y *Penicillium sp* a la misma vez, aproximadamente a los dos días como se ve reflejado en la tabla 4. En cuanto a *T. saturnisporum* no logra datos muy reveladores.

5.2.2.- Porcentaje de mortalidad corregido Abbot.



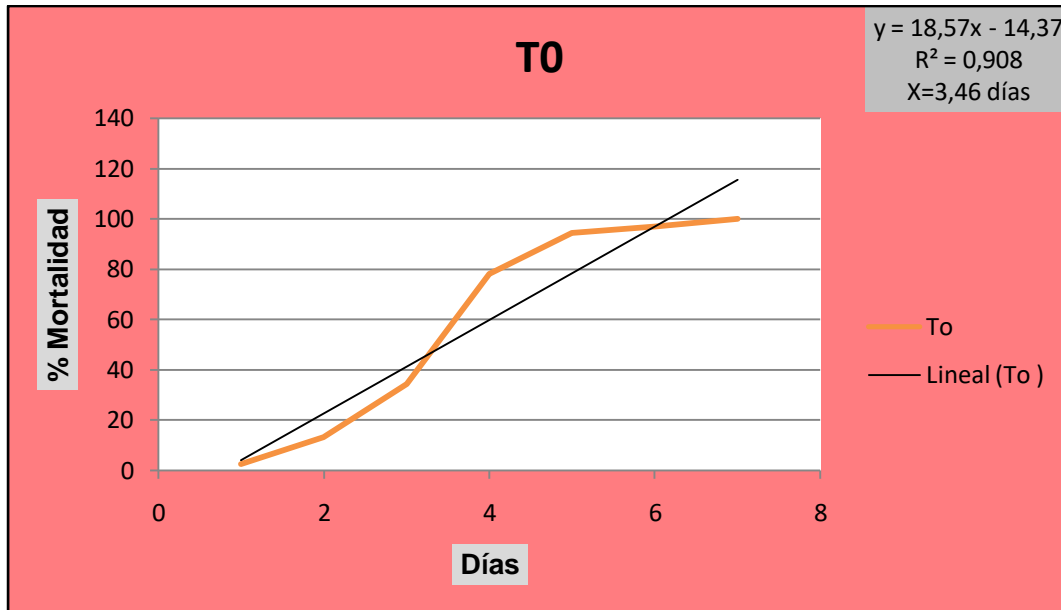
Gráfica 14: Porcentaje de mortalidad corregido de Abbot a los 3 días de tratamiento.

Como observamos en la gráfica 14, todos las cepas de hongos utilizados en la especie *Melanaphis sacchari* exhiben datos que mejoran los datos de T0, solo *Trichoderma aggressivum* presenta una eficacia mayor durante todo el ensayo.

En cuanto a los datos globales según el porcentaje de mortalidad corregido con TA, CI y CONT se consigue una mortalidad de más de un 30% en los 3 hongos, por tanto son datos bastante interesantes ya que se consigue aumentar la mortalidad en el tiempo. TS mejora los datos pero no alcanza el porcentaje del resto de los 3 hongos entomopatógenos, siendo poco interesante su control biológico en esta especie de áfido.

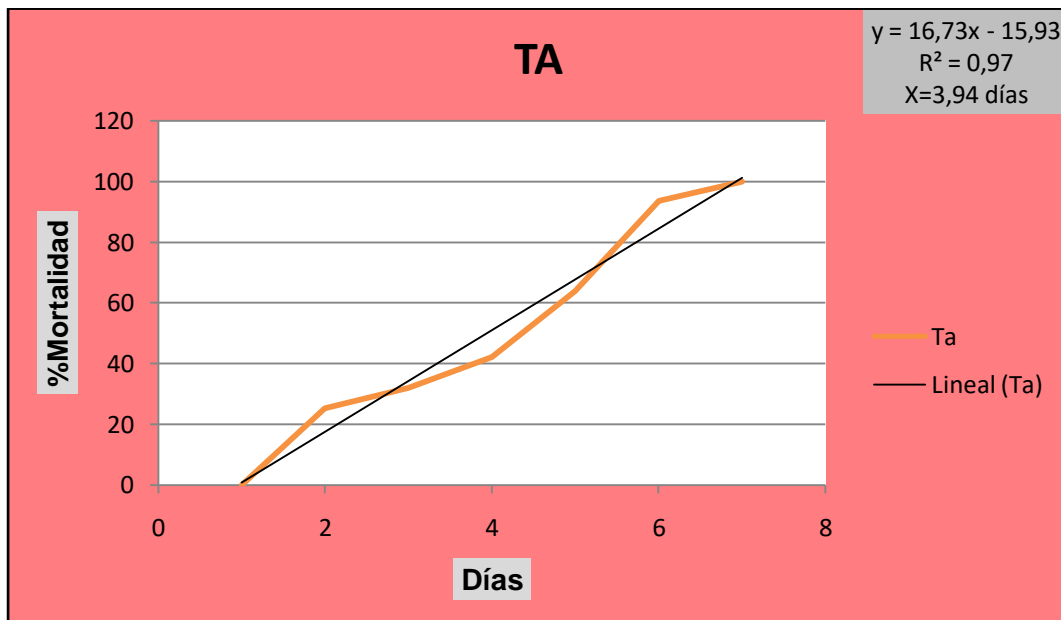
5.3.-Gráficas de *Myzus persicae*

5.3.1.- Graficas porcentaje mortalidad medio.



Gráfica 15: Porcentaje de mortalidad medio de **T0**.

T0 presenta una mortalidad del 50% a los 3,46 días. Esto nos permitirá tener una perspectiva de los hongos entomopatógenos más eficaces a mitad del tratamiento. Siendo los más eficaces aquellos que obtengan la mitad de mortalidad antes de 3,46 días.



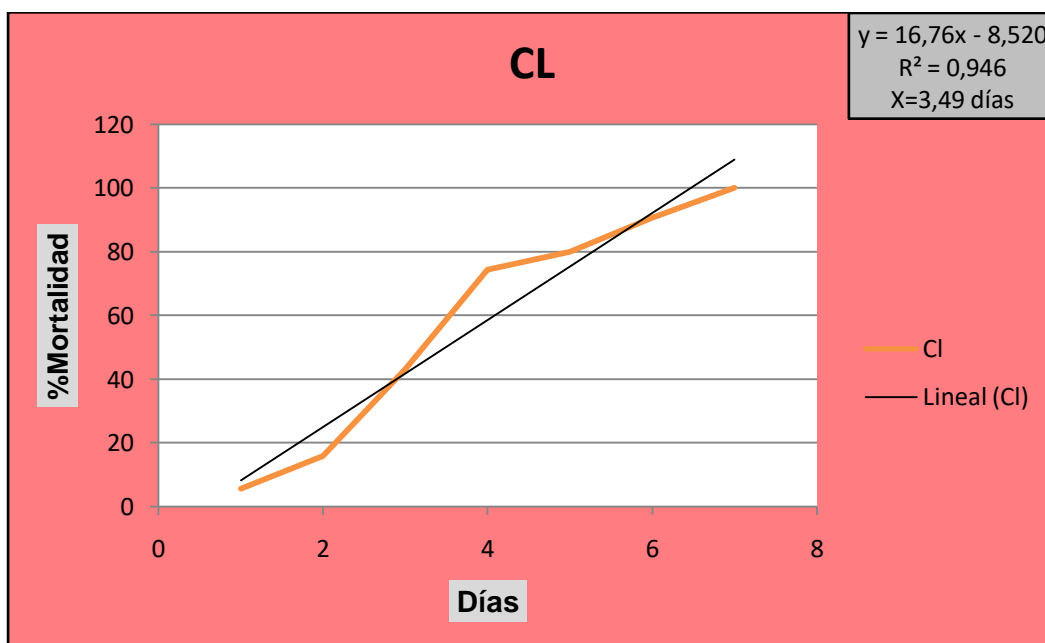
Gráfica 16: Porcentaje de mortalidad medio de **Trichoderma aggressivum**.

Trichoderma aggressivum alcanza el porcentaje medio en la especie *Myzus persicae* a los 3,94 días, no obteniéndose datos deseables.



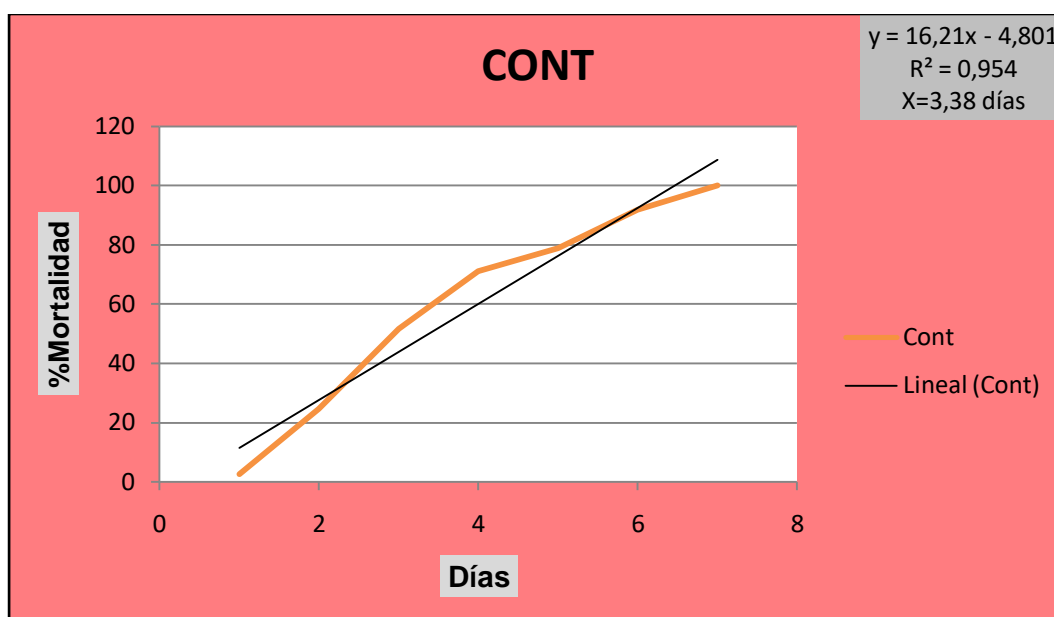
Gráfica 17: Porcentaje de mortalidad medio de *T. saturnisporum*.

La mortalidad media de *Trichoderma saturnisporum* se alcanza a los 3,32 días, mejorando los datos de T0.



Gráfica 18: Porcentaje de mortalidad medio de *Cladosporium sp.*

Cladosporium sp llega al 50% de mortalidad a los 3,49 días. No son datos óptimos debido a que necesita más tiempo para llegar al LT50 que T0.



Gráfica 19: Porcentaje de mortalidad de *Penicillium sp.*

El porcentaje de mortalidad medio de *Penicillium sp* se produce a los 3,38 días, reduce el tiempo con que alcanza el LT50 con respecto a T0.

Mortalidad 50%	Hongos	Días
	T0	3,46
	<i>Trichoderma aggressivum</i>	3,94
	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	3,32
	<i>Cladosporium sp.</i>	3,49
	<i>Penicillium sp.</i>	3,38

Tabla 5: Representación de **LT50** frente a *Myzus persicae*.

En la especie *Myzus persicae* no se han obtenido datos que presenten una gran variación con T0, solo *Trichoderma saturnisporum* y *Penicillium sp* exhiben datos mejores con 3,32 y 3,38 días, mientras que *Trichoderma aggressivum* y *Cladosporium sp* no han conseguido reducir la mortalidad media de T0.

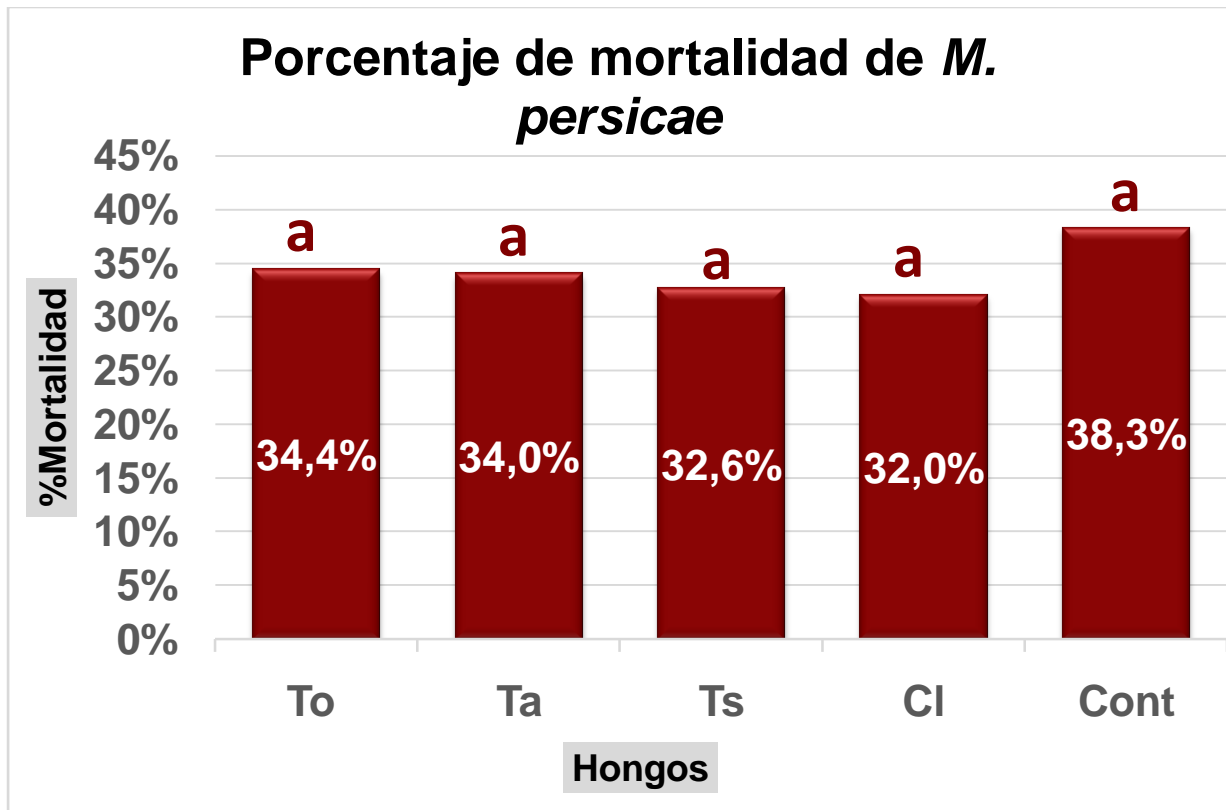
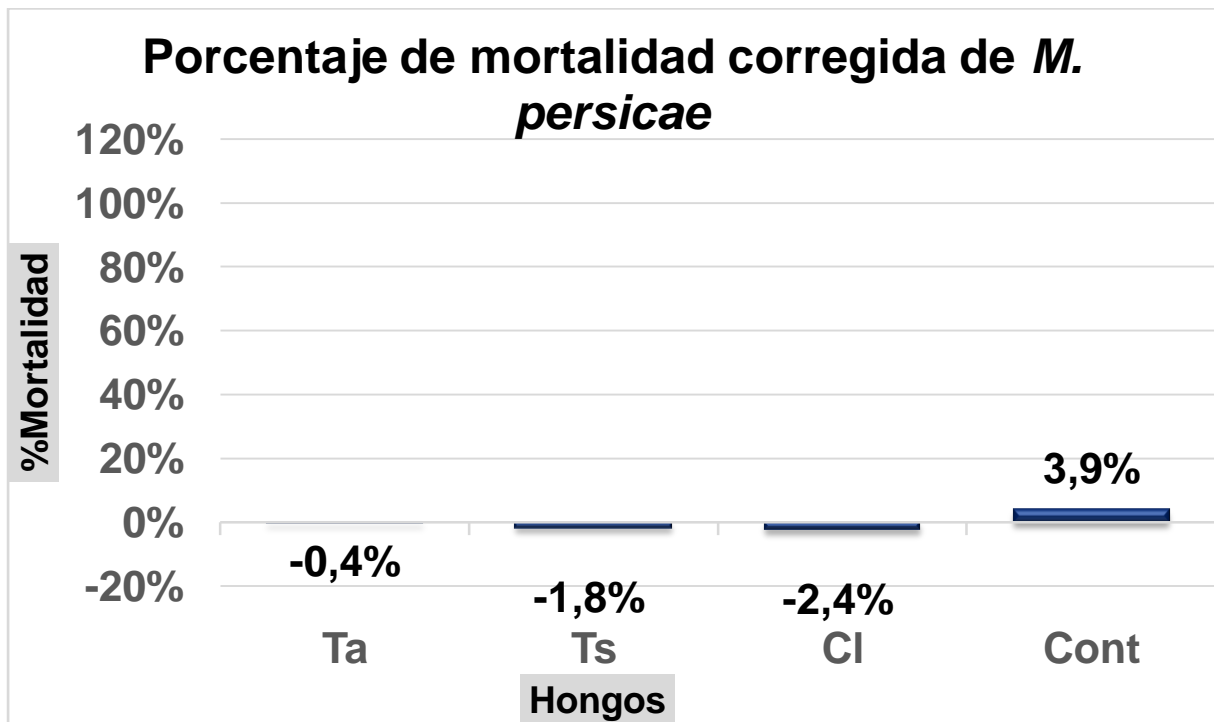


Gráfico 20: Porcentaje de mortalidad medio total de los 4 hongos entomopatógenos.

Según los datos obtenidos en el ensayo y reflejados en la gráfica 20, no se han logrado datos deseados durante el global del ensayo. Al inicio se ve como *Trichoderma saturnisporum* y *Penicillium sp* son capaces de lograr unos datos esperanzadores, pero mientras avanza el ensayo vemos como ningún hongo a partir del 3º día es capaz de presentar una mejoría en el porcentaje de mortalidad con respecto al control.

5.3.2.- Porcentaje de mortalidad corregido Abbot

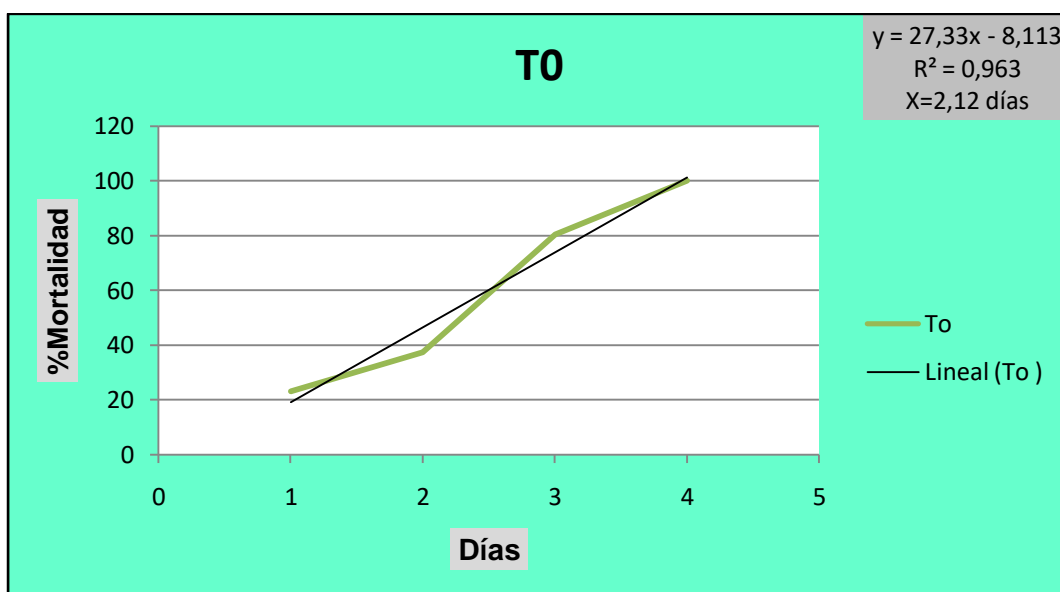


Gráfica 21: Porcentaje de mortalidad corregido de Abbot a los 3 días de tratamiento.

Como observamos en la gráfica 21, no se han obtenido datos concluyentes. Ningún hongo entomopatígeno ha supuesto un incremento en la mortalidad relevante en la especie *Myzus persicae* con respecto a T0 (control).

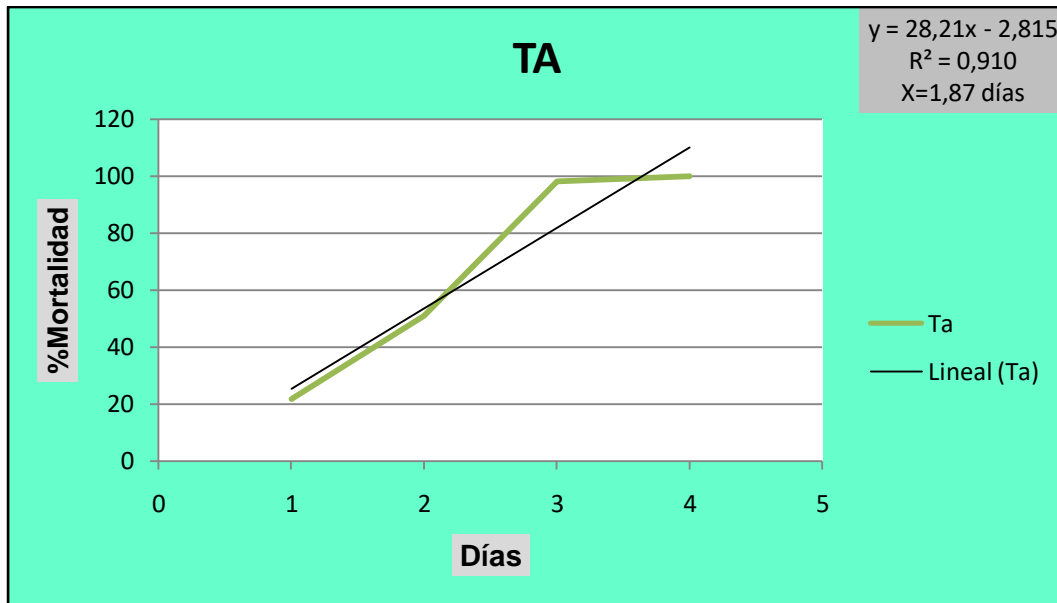
5.4.-Gráficas de *Rhopalosiphum padi*

5.4.1.- Graficas porcentaje mortalidad medio.



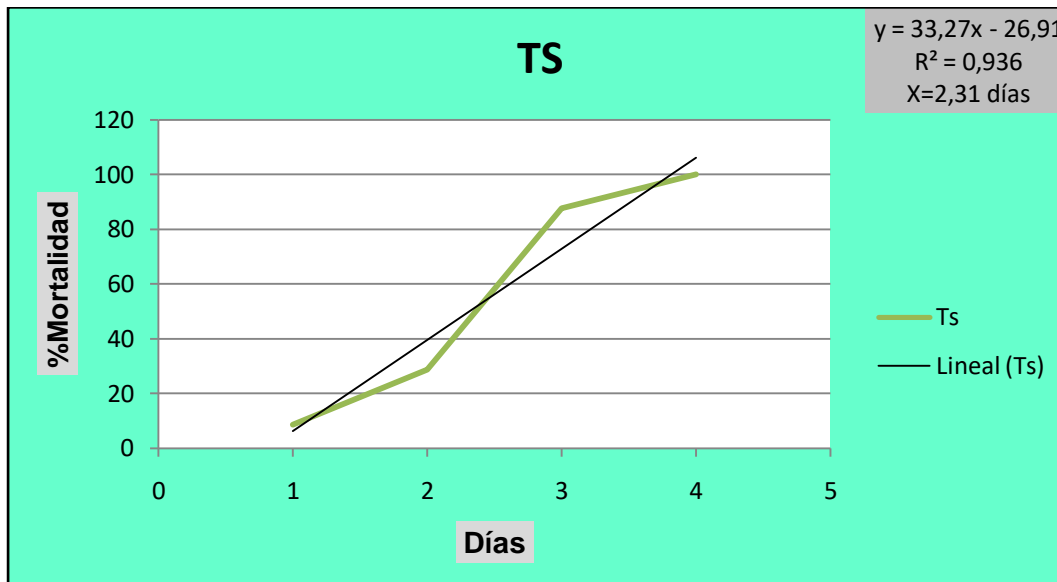
Gráfica 22: Porcentaje de mortalidad medio de T0.

T0 presenta una mortalidad del 50% a los 2,12 días. Esto nos permitirá tener una perspectiva de los hongos entomopatogenos más eficaces a mitad del tratamiento. Siendo los más eficaces aquellos que obtengan la mitad de mortalidad antes de 2,12 días.



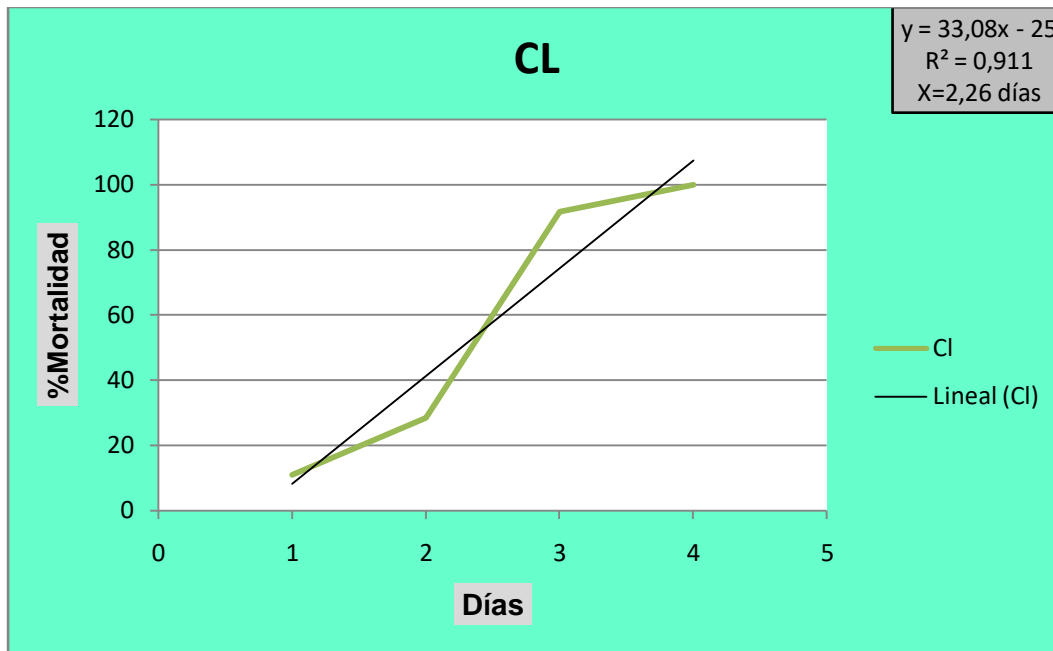
Gráfica 23: Porcentaje de mortalidad medio de *Trichoderma aggressivum*.

Trichoderma aggressivum muestra un porcentaje medio de mortalidad a los 1,87 días, mejorando los datos de T0.



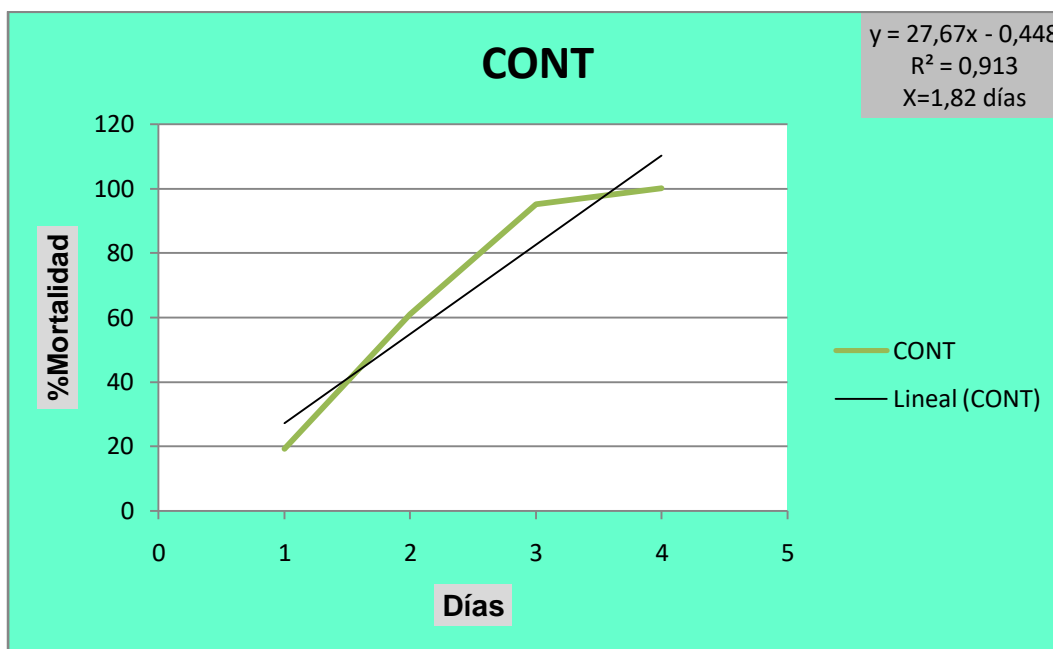
Gráfica 24: Porcentaje de mortalidad medio de *Trichoderma saturnisporum*.

Trichoderma saturnisporum no ha mostrado datos relevantes en el porcentaje medio de mortalidad, ya que es superior a T0. Por lo que no muestra datos deseados.



Gráfica 25: Porcentaje de mortalidad medio de *Cladosporium sp.*

Cladosporium sp al igual que *Trichoderma saturnisporum* no presenta datos relevantes. Su 50% de mortalidad lo alcanza después que T0.



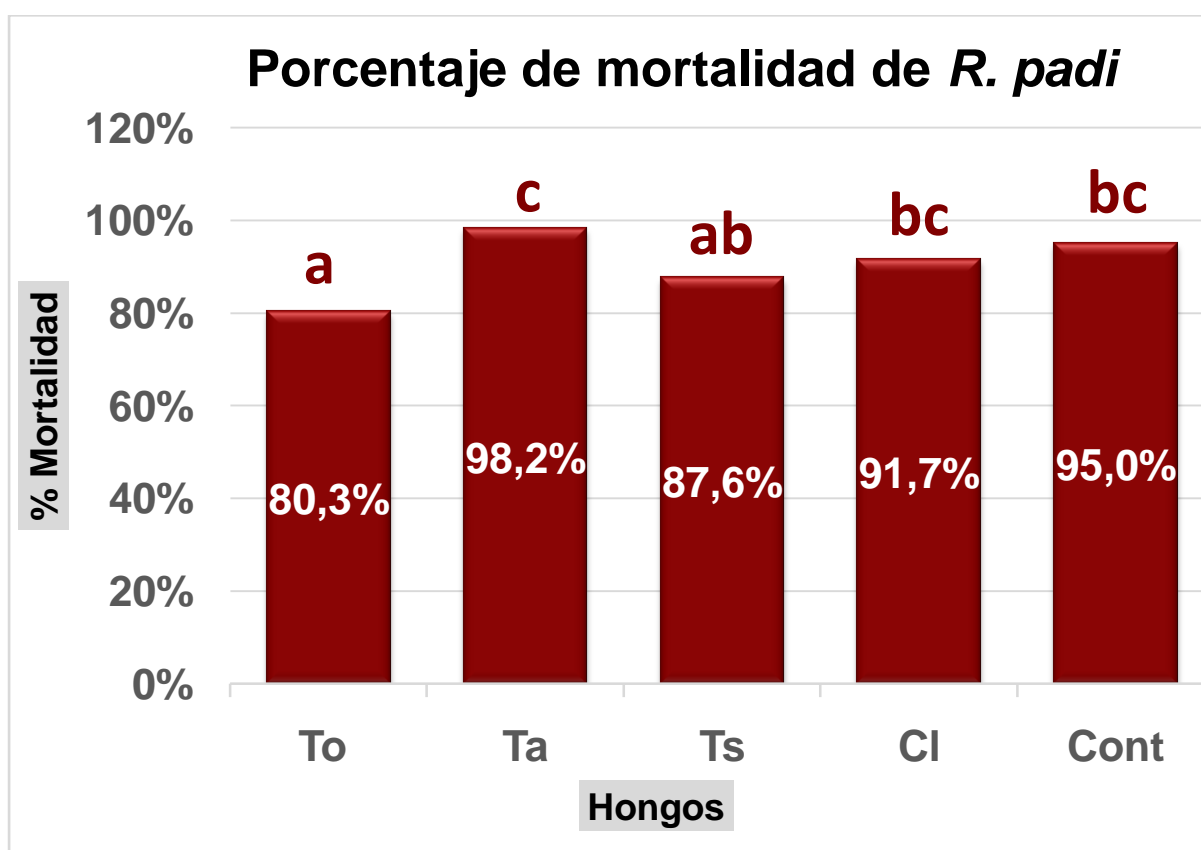
Gráfica 26: Porcentaje de mortalidad medio de *Penicillium sp.*

El porcentaje medio de mortalidad de *Penicillium sp* se alcanza a los 1,82 días, por lo que muestra datos deseados, mejorando los de T0.

Mortalidad 50%	Hongos	Días
	T0	2,12
	<i>Trichoderma aggressivum</i>	1,87
	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	2,31
	<i>Cladosporium sp.</i>	2,26
	<i>Penicillium sp.</i>	1,82

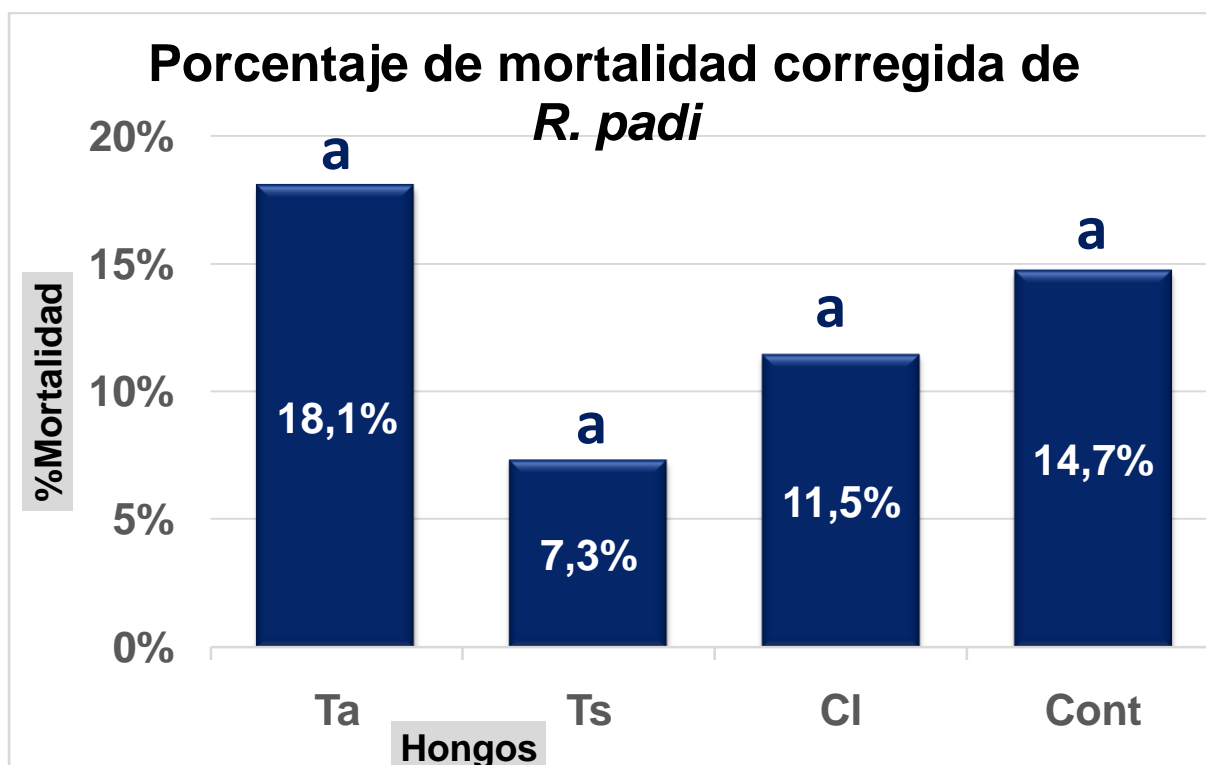
Tabla 6: Representación de **LT50** frente a *Rhopalosiphum padi*.

Según los datos reflejados en la tabla 6, *Penicillium sp* y *Trichoderma aggressivum* presentan una **mortalidad mayor en el LT50**, siendo de este primero ligeramente más alta. Sin embargo, *Cladosporium sp* y *Trichoderma saturnisporum* superan los 2,12 días de mortalidad media de T0, no aportando datos esperados.



Gráfica 27: Porcentaje de mortalidad medio para cada tratamiento medido a los 3 días del ensayo.

5.4.2.- Porcentaje de mortalidad corregido Abbot



Gráfica 28: Porcentaje de mortalidad corregido de Abbot a los 3 días de mortalidad.

Los datos indican que *Trichoderma aggressivum* y *Penicillium sp* además de tener un LT50 mayor con respecto a los demás hongos, también presentan un porcentaje mayor en el tercer día de ensayo. Aún así *T. aggressivum* es el hongo entomopatogeno con mayor eficacia de mortalidad en el tercer día siendo interesante su estudio en campo, aunque dado la variabilidad de los resultados no muestran diferencias significativas.

5.5.-Discusión de datos de otros ensayos

La utilización de *Trichoderma sp* como método de control de plagas cada vez va mas en aumento, mostrando datos esperanzadores. Por ejemplo Banderas y Adriana (2004) tratan de demostrar en su trabajo la efectividad de *Trichoderma harzianum* para el control de *Atta colombica*. Se demuestra la capacidad que tiene *T. harzianum* en reducir la mortalidad en 6 días de las hormigas soldado y en 8 días en las hormigas reina de la especie *Atta colombica*. Además se demuestra que *T. harzianum* primero acaba con el hongo *Attamyces sp* que sirve de alimento a las hormigas, lo que produce un efecto secundario en la muerte de esta especie al no encontrar este hongo simbiote que le provee de alimento.

Otro ejemplo sería el de Sundaravadivelan y Padmanabhan (2014), que demostraron la efectividad de *T. harzianum* como control biológico al registrar una

mortalidad del 96% en la especie *Aedes aegypti*.

Otro caso de control biológico por parte de la especie *Trichoderma sp*, es el ensayo realizado por Arriola-Padilla et al., (2014) que muestran que concentraciones bajas (5×10^{-7}) y altas ($3,6 \times 10^{-8}$) de conidios/mililitros obtienen porcentajes de mortalidad bastantes altos, lo que desempeña una buena forma de control de la especie *Dendroctonus spp*.

En cuanto a *Penicillium sp* podemos destacar el ensayo propuesto por Espinoza (2009), el cual confirma la patogenicidad de *Penicillium sp* sobre *Tenebrio molitor* alcanzando una mortalidad del 70% a los 10 días.

Otro trabajo a destacar es el realizado por Santamaria et al., (2002) en el cual se ha utilizado diferentes cepas de *Penicillium sp*, siendo 3 cepas de *Penicillium oxalicum* y una de *Penicillium decumbers*. Entre estas cepas destaca *P. oxalicum* que muestra los mejores resultados frente a bacterias, hongos e insectos, como consecuencia de la producción de metabolitos activos con efecto antagonista. El estudio muestra como las larvas de *Scolytus multistriatus* y *S. scolytus* presentan una mortalidad natural del 21,2 y 17,6% respectivamente, pero con la aplicación de *P. oxalicum* la mortalidad aumenta un 60%.

Para el hongo *Cladosporium sp* destaca el trabajo realizado por Gámez-Guzmán et al., (2019) donde se utiliza la cepa de *Cladosporium cladosporioides*, para el control de ácaro bimaclado *Tetranychus urticae*, con diferentes concentraciones de conidias obteniendo datos muy reveladores como que todos los tratamientos lograron un control al menos del 50%, siendo las concentraciones de 2×10^7 y 2×10^8 las de mayor mortalidad con 73,3% y 81,7% respectivamente.

También podemos destacar los datos recogidos por El-Sawy et al., (2019), quienes utilizan los metabolitos secundarios de *C. cladosporioides* contra *Aphis gossypii*, comprobando que la mortalidad de los adultos en el primer día varía entre 20-46,67% y en el 5º día se produjo la máxima mortalidad entre un 40-96,67%. Mientras que a lo que se refiere a las ninfas la mortalidad del primer día fue de 20-53,33% y la máxima mortalidad se produce en el 3º día con un 46,67-96,67% por lo que tiene mayor efectividad en los primeros estadios ninfales, mostrando un índice de toxicidad del 100%.

5.6.-Parasitismo discusión

Tras la realización del proceso de parasitismo se comprobó que el hongo *Penicillium* sp fue el único hongo que parasito interiormente el organismo del pulgón de la especie *Aphis gossypii* y exteriormente (cutícula) a la especie *Melanaphis sacchari*.

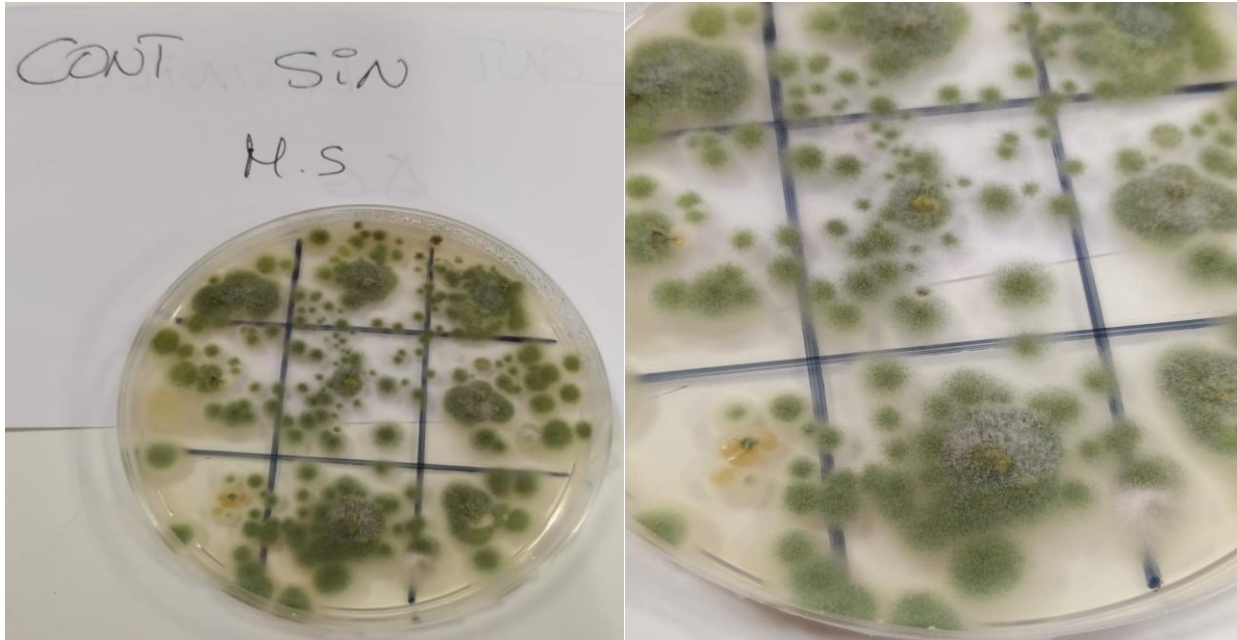


Imagen 38: PDA con pulgones de la especie *Melanaphis sacchari* sin desinfectar. Parasitados en la cutícula por *Penicillium* sp.

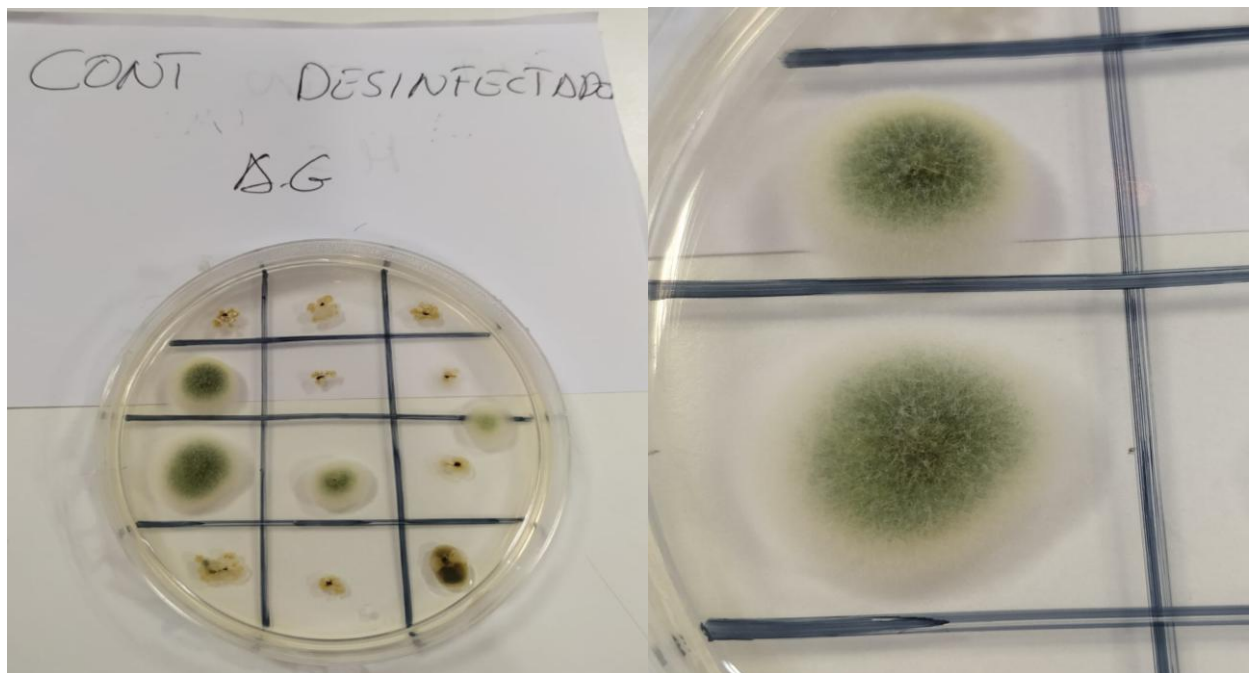


Imagen 39: PDA con pulgones desinfectados de la especie *Aphis gossypii*. Parasitados en el interior del organismo por *Penicillium* sp.

6.- Conclusiones

En el presente trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. La alta mortalidad detectada en los testigos como consecuencia de la metodología seguida no ha permitido obtener resultados positivos destacables a tener en cuenta para cada uno de los tratamientos.
2. Para la especie *R. padi*, se ha podido observar que la aplicación de *Trichoderma aggressivum*, *Penicillium sp* y *Cladosporium sp*, da lugar a incrementos en la mortalidad de dicha especie en un porcentaje de 18,1%, 14,7% y 11,5% respectivamente.
3. Para la especie *M. sacchari*, se ha podido observar que la aplicación de *Trichoderma aggressivum*, *Penicillium sp* y *Cladosporium sp* da lugar a incrementos en la mortalidad de dicha especie en un porcentaje de 38,8%, 38,6% y 35,3% respectivamente.

Recomendación:

Nuestro estudio ha consistido en un ensayo preliminar, para determinar la posibilidad de estas 4 especies fúngicas como agentes entomopatógenos. Es necesario en primer lugar cambiar la metodología y realizar pulverizaciones adecuadas con un tamaño de gota, que no de lugar a una elevada mortandad de los testigos durante el proceso. Para ello, en posteriores estudios se realizará la pulverización mediante Torre de Potter. Por otra parte, hay que realizar ensayos de dosis para comprobar cual es la más efectiva para incrementar la mortandad en los distintos tratamientos y comprobar el efecto negativo que pudiera tener en los enemigos y depredadores naturales.

7.-Bibliografía

A

Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, 18(2), 265-267.

Agrios, G. N. (2005). Plant diseases caused by fungi. *Plant pathology*, 4.

Alonso, S. (2012). *Cladosporium*: género fúngico que deteriora soportes documentales y afecta a la salud del hombre. *Boletín del Archivo Nacional*, 20, 104-118.

Aparicio, V., Casado, E., Lastres, J., & Belda, J. E. (2001). Producción Integrada en los cultivos hortícolas bajo abrigo en Almería. *Agrícola Vergel*, (230), 75-81.

Arenas, O. R., Lara, M. H., Huato, M. A. D., Hernández, F. D., & Victoria, D. A. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151.

Arriola, V. J., Renteria, J., Gijón, A. R., Ramírez, L., & Romero, m. e. (2014) Evaluación de *Trichoderma sp.*, como agente de control biológico de *Dendroctonus spp.* (Curculionidae: scolytinae) en la sierra gorda de Querétaro, México. *Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en conservación y Mejoramiento de Ecosistemas. Tecnológico de Estudios Superiores de Huixquilucan*.

B

Banderas, G., & Adriana, E. (2004). Control de *Atta colombica* con los hongos *Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana* y el insecticida Malation.

Barbagallo, S., Cravedi, P., Pasqualini, E., & Patti, I. (1998). *Pulgones de los principales cultivos frutales* (No. SB945. P64. P84 2000.). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Beltrán, F. D., Parra, A., Roldán, A., Soler, A., & Vila, E. (2012). Pasado, presente y futuro del control integrado de plagas en la provincia de Almería. *Cuadernos de Estudios Agroalimentarios (CEA)*, (1), 27-43.

Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2357 - 2372.

Blackman, R.L & Eastop, V.F. (1984). *Aphids on the world's Crops. An Identification and Information Guide*. Chichester, UK: John Wiley.

Bridge, P. D., Kozaciewicz, Z., & Paterson, R. R. M. (1992). *PENIMAT: a computer assisted identification scheme for terverticillate Penicillium isolates* (No. 165). CAB International.

C

Cabello, T., & Cañero, R. (1994). Mezcla de productos plaguicidas empleados en cultivos hortícolas en invernaderos del SE de España. Análisis de costes. *Bol. San. Veg. Plagas*, 20(2), 429-436.

Cancino, E. R. (1997). La Compleja Vida de los Pulgones

Cano, E., López, J. A., Cano, E., Carballo, C. V., & Guharay, F. (2004). *Control biológico de plagas agrícolas* (No. 53). Bib. Orton IICA/CATIE.

Cañizares, E.; Ortiz, F.; López, I., (2013). "Introducción a la trazabilidad en la industria agroalimentaria". *Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera*, 2013. 1-19 p.

Carballo, M., & Guharay, F. (2004). Control biológico de plagas agrícolas. *España: Edit. Managua*.

Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. *Universidad Nacional de Salta, Argentina*, 118.

Carver, M. (1991). Hemiptera. *The insects of Australia-a textbook for students and research workers*, 429-509.

Chávez, M. P. (2006). Producción de *Trichoderma sp.* y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*).

Costa-Comelles, J., Soto, A., Alonso, A., Rodríguez, J. M., & García-Marí, F. (1994). El pulgón *Aphis gossypii* Glover: Eficacia de algunos plaguicidas en cítricos y su acción sobre el fitoseido *Euseius stipulatus* AH. *Levante Agrícola*, 328, 201-213.

D

DeBach, P. (1974). *Biological Control By Natural Enemies*. 323 pp. *Cambridge University Press: Cambridge*.

Denmark, H. A. (1988) Sugarcane aphids in Florida (Homoptera: *Aphididae*). *Sugarcane aphids in Florida (Homoptera: Aphididae)*. 302.

Diáñez, F., Santos, M., Carretero, F., & Marín, F. (2016). *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 1934-1944.

Díaz, M. P., Macías, A. F., Navarro, S. R., & De La Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.

Díaz, J. F. J. (2008). Estudio de caso del Poniente almeriense. Glocalización de la horticultura. *Papers: revista de sociologia*, (90), 83-104.

Díaz, B., Susan, V. R., & Castiel, A. F. (2014). Control biológico de plagas y

enfermedades de los cultivos. In *Biotecnología y medioambiente* (pp. 291-306). Editorial Ephemera.

Dughetti, A. (2012). Pulgones: Clave para identificar las formas ápteras que atacan a los cereales. *RIAN, Red de información agropecuaria nacional. INTA y Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*.

Durante, M. P. M., Nafría, J. M. N., & Delfino, M. A. (1990). Ampliación del conocimiento de la fauna de pulgones (Hom. Aphidoidea) de Andalucía. *Zoologica baetica*, (1), 7-32.

E

Espinoza, G. (2009). *Selección de hongos entomopatógenos para el control del piojo harinoso de la vid (Planococcus ficus (Signoret) (Master's thesis)*.

El-Sawy, M., Mostafa, E. H., & Ismail, N. (2019). Secondary Metabolites of the Entomopathogenic Fungus, *Cladosporium cladosporioides* and its Relation to Toxicity of Cotton Aphid, *Aphis gossypii* (Glov.). *International Journal*, 5(1), 115-120.

F

Fereres, A. (1991). Insectos vectores de virus en cultivos hortícolas. *Phytoma-España*, 30, 82-87.

G

Gámez-Guzmán, A., Torres-Rojas, E., & Gaigl, A. (2019). Potential of a *Cladosporium cladosporioides* strain for the control of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: *Tetranychidae*) under laboratory conditions. *Agronomía Colombiana*, 37(1), 84-89.

H

Hidalgo, A. (1989). *Comparación de dos métodos para la selección de aislamientos de Trichoderma para el combate biológico de Fusarium y Rhizoctonia en clavel* (San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica).

K

Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., & Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*, 41(1), 37-42.

L

Lavandero, B., Muñoz, C., Barros, W. (2006). El talón de Aquiles del control biológico: una nueva visión para su éxito. *Agro-Ciencia*. 22. 111-123.

López, F. (1989). "Residuos de plaguicidas en hortícolas". En Acta de las II Jornadas

Nacionales de Cultivos Protegidos, Colegio Oficial de Ingenieros técnicos y Peritos Agrícolas: 1-32.

López, A. R., Dávila, M. F., Uribe, L. A. A., Villegas, R. G., Jiménez, N. V., & Ortiz, H. E. V. (2013). Diversidad de áfidos (*Hemiptera: Aphididae*) en el sureste de Coahuila. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(7), 987-997.

Lozano, A. M. (2005). *Incidencia y dispersión de virus transmitidos por pulgones en hortícolas de invierno y sus relaciones virus-vector* (Doctoral dissertation, Universidad Politécnica de Madrid).

M

Martínez, E. (2004). *Estudio de especies micotoxígenas del género Penicillium Penicillium verrucosum Dierckx*. Universitat Autònoma de Barcelona.

Monzón, A. (2002). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua.

Méndez, R. J., & Reyes Velásquez, R. M. (2010). *Evaluación de Trichoderma harzianum como agente de control biológico de enfermedades fungosas de suelo en el vivero de aclimatación de café clonado en la Finca La Cumplida, San Ramón, Matagalpa* (Doctoral dissertation).

Mier, M. P. & Nieto, J. M. (1998). Hemíptera, *Aphididae* I. In Fauna Ibérica, Vol. 11. Ramos M.A. et al. (Eds). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid. 288-299 pp.

Miyazaki, M. (1987b): "Morphology of aphids"; en Minks, a. k. y Harrewijn, p., eds.: Aphids. Their biology, natural enemies and control (A). *Ámsterdam, Elsevier*, pp. 1-25

N

Nibouche, S., Costet, L., Holt, J. R., Jacobson, A., Pekarcik, A., Sadeyen, J. & Medina, R. F. (2018). Invasion of sorghum in the Americas by a new sugarcane aphid (*Melanaphis sacchari*) superclone. *PLoS One*, 13(4).

P

Palomar, F. (1994): *Los invernaderos en la provincia de Almería, Instituto de Estudios Almerienses, Almería*.

Peña-Martínez, R. (1985). Ecological notes on aphids of the high plateau of Mexico, with a check-list of species collected in 1980. In: biosystematic and evolution of aphids. Proceedings of the internacional Symposium. *Polska Akademia Nauk*. 425-430 pp.

Pitt, J. I., & Leistner, L. (1991). Toxigenic *Penicillium* species. *Mycotoxins and animal foods*, 81-99.

Pitt, J. I. (1997). Hocking. *AD Fungi and Food Spoilage*. 2^o ed. London, Wienheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Blackie Academic & Professional.

R

Ramakers, P. M. J., & Heinz, K. M. (2004). IPM Program for sweet pepper. Biocontrol in protected cultura. Ball Publishing, Batavia, pp. 439-456.

Raven, K. P., & Hossner, L. R. (1993). Phosphorus desorption quantity-intensity relationships in soils. *Soil Science Society of America Journal*, 57(6), 1501-1508.

Remaudière, G., & Remaudiere, M. (1997). *Catalogue of the world's Aphididae: Homoptera Aphidoidea*. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

S

Salmerón, V. A., Sánchez, E. M. C., García-Testón, J. L., & Belda, J. E. (2001). Producción Integrada en los cultivos hortícolas bajo abrigo en Almería. In *El sector agrario y agroalimentario de Almería ante el siglo XXI: evolución y perspectiva de nuestra agricultura en el año 2000: producción integrada: incidencia de las nuevas normativas de residuos de plaguicidas sobre la horticultura almeriense* (pp. 183-191). Instituto de Estudios Almerienses.

Santamarina, M. P., Roselló, J., Llacer, R., & Sanchis, V. (2002). Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai isolates against fungi, bacteria and insects in vitro. *Revista iberoamericana de micología*, 19(2), 99-103.

Santos, M., Diáñez, F., & Carretero, F. (2013). Nueva cepa de *Trichoderma saturnisporum*, composiciones y aplicaciones de la misma.

Santos, M., Diáñez, F., de Cara, M., Camacho, F., & Tello, J. (2010). El control biológico de plagas y enfermedades. Un encuadre crítico. *Cuad. Estud. Agroaliment*, 1, 61-72.

Senasica. (2014). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria Pulgón amarillo *Melanaphis sacchari* (Zehntner). *Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria*. México, D.F. *Ficha Técnica*, no 43, 15 p.

Singh, J. S., & Seneviratne, G. (Eds.). (2017). *Agro-Environmental Sustainability*. Springer.

Stern, V., Smith, R., Van den Bosch, R., & Hagen, K. (1959). The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: the integrated control concept. *Hilgardia*, 29(2), 81-101.

Sundaravadivelan, C., & Padmanabhan, M. N. (2014). Effect of mycosynthesized silver nanoparticles from filtrate of *Trichoderma harzianum* against larvae and pupa of dengue vector *Aedes aegypti* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(6), 4624-4633.

T

Tello, J. C., & Camacho, F. (2010). Organismos para el control de patógenos en los cultivos protegidos. *Prácticas culturales para una agricultura sostenible. Fundación Cajamar. Colección Agricultura. Almería.*

W

Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.

Williams, I. S., & Dixon, A. F. (2007). Life cycles and polymorphism. *Aphids as crop pests*, 69-85.

Williams, J., Clarkson, J. M., Mills, P. R., & Cooper, R. M. (2003). Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(7), 4192-4199.

Z

Zamora, J. E. G., Martínez, N. L., Guerrero, M. A., Fuentes-Guerra, J. M. U., Hernández, C. A. (2008).
http://ocwus.us.es/produccion-vegetal/sanidad-vegetal/Sanidad_vegetal/Tema%2010_HTML/page_17.htm/

Web.

<https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/actualidad/noticias/detalle/115092.html>.

<http://fernandorivero2punto0.blogspot.com/2015/02/reproduccion-sexual-partenogenetica-del.html>

http://ocwus.us.es/produccion-vegetal/sanidad-vegetal/Sanidad_vegetal/Tema%2010_HTML/page_17.htm/

<http://www.hortoinfo.es/index.php/plagas/572-pulgón-algodonero-aphis-gossypii-15-12>

<https://www.koppert.es/retos/pulgones/pulgon-del-algodon/>

<http://www.hortoinfo.es/index.php/plagas/566-pulgon-verde-persicae-22-02-14>

<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/visorraif/Ayudas/TrigoDuro/1102.pdf>

