

**“Evaluación de hongos entomopatógenos
(Ascomycota: Hypocreales) como potenciales
controladores de la langosta sudamericana
Schistocerca cancellata (Orthoptera: Acridoidea)
y su posible aplicación como bioinsecticidas”**

*Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae de la
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.*

Universidad Nacional de La Plata

Tesista: Ing. Agr. Hector E. Medina

Año 2023



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



Director:
Dr. Sebastian Pelizza

Codirector:
Dr. Eduardo Wright

Jurado de Tesis
Ing. Agr. Gustavo Dal Bello
Dra. Ing. Agr. Gabriela S. Lucero
Dra. Andrea Toledo

Fecha de defensa de tesis: 14/03/2023

Publicaciones derivadas de la tesis

Pelizza, S.A., **Medina, H.**, Ferreri, N.A., Elfades, L.A., Pocco, M.E., Stenglein, S.A., Lange, C.E. 2018. Virulence and enzymatic activity of three new isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) from the South American locust *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae). Journal of King Saud University – Science <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.11.006>

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Características generales de las langostas	1
1.2 Identificación de la langosta sudamericana <i>Schistocerca cancellata</i>	3
1.3 Aspectos generales de la biología de <i>S. cancellata</i>	4
1.4 Distribución e importancia histórica de la langosta sudamericana	6
1.5 Resurgimiento de la plaga en el periodo 2015 - 2020.....	9
1.5.1 Hipótesis sobre el resurgimiento.....	11
1.6 Impacto de la plaga	12
1.7 Control de langostas.....	13
1.8 Productos fitosanitarios contra langostas, a base de Agentes de Control Biológico (ACB) en la Argentina	14
1.9 Hongos entomopatógenos como biocontroladores de plagas	16
1.10 Antecedentes de control biológico de langostas en el mundo.....	18
1.11 Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos	19
1.12 Objetivo general.....	21
1.13 Objetivos específicos	21
1.14 Hipótesis.....	22
CAPÍTULO 2.....	23
Prospección, detección, estudio e identificación de especies de hongos entomopatógenos que afectan naturalmente a <i>Schistocerca cancellata</i>	23
2.1 Introducción	23
2.2 Materiales y métodos	23
2.2.1 Sitios de muestreo	23
2.2.2 Cría de insectos	24
2.2.3 Aislamiento de hongos entomopatógenos en laboratorio a partir del insecto infectado.....	25
2.3 Resultados	26
2.4 Conclusiones parciales	28

CAPÍTULO 3	30
Evaluación bajo condiciones controladas de laboratorio de la patogenicidad y virulencia de hongos entomopatógenos aislados a partir de ejemplares parasitados de la langosta sudamericana <i>S. cancellata</i>	30
3.1. Introducción	30
3.1 Materiales y métodos	31
3.1.1 Ensayos de patogenicidad	31
3.1.2 Análisis estadístico	32
3.2 Resultados	33
3.3 Conclusiones parciales	38
CAPÍTULO 4	39
Actividad enzimática (proteolítica, lipolítica y quitinolítica), en condiciones de laboratorio de aislados de <i>B. bassiana</i> obtenidos a partir de <i>Schistocerca cancellata</i> ..	39
4.1 Introducción	39
4.2 Materiales y métodos	39
4.2.1 Producción de enzimas a diferentes temperaturas	39
4.2.2 Análisis Estadístico	40
4.3 Resultados	40
4.4 Conclusiones parciales	41
CAPÍTULO 5	42
Evaluación preliminar, bajo condiciones de campo, de la actividad de control del aislado <i>Beauveria bassiana</i> LPSc 1227 sobre langosta sudamericana <i>S. cancellata</i>	42
5.1 Introducción	42
5.2 Materiales y métodos	43
5.2.1 Ensayo preliminar bajo condiciones de semi-campo contra ninfas de la langosta <i>S. cancellata</i>	43
5.3 Resultados	46
5.4 Conclusiones parciales	46
CAPÍTULO 6	48
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES	48
6.1 Discusión	48
6.2 Conclusiones	50
BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1: Resultado del análisis de varianza para la mortalidad causada por los distintos aislados de *Beauveria bassiana* LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227, a distintas concentraciones, sobre ninfas de tercer estadio de la langosta *Schistocerca cancellata*. Pág. 35

Tabla 3.2: Valores de CL₅₀ con límites de confianza del 95% de los aislados de *Beauveria bassiana* sobre ninfas de tercer estadio de la langosta sudamericana *Schistocerca cancellata*. Pág. 35

Tabla 3.3: Tabla de comparaciones múltiples, para cada uno de los aislados de *B. bassiana* para la concentración de 1×10^8 conidios/ml, en lo que respecta al TMS de acuerdo al test de Kaplan-Meier. Pág. 36

Tabla 3.4: Tabla de comparaciones múltiples, para cada uno de los aislados de *B. bassiana* para la concentración de 1×10^6 conidios/ml, en lo que respecta al TMS de acuerdo al test de Kaplan-Meier. Pág. 36

Tabla 4.1: Resultados de la actividad lipolítica, proteolítica y quitinolítica de los aislados de *Beauveria bassiana* LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227, a diferentes temperaturas, 4 °C, 15 °C y 26 °C. Los datos son medias de tres réplicas \pm desvío estándar. Pág. 41

Tabla 4.2: Análisis de varianza (ANOVA) sobre las actividades lipolíticas, proteolíticas y quitinolíticas de los aislados de *Beauveria bassiana* LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227, a diferentes temperaturas y la interacción entre dichas variables. Pág. 41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Ninfas de *S. cancellata* en distintas fases. Jujuy, Argentina. 2018. *Pág. 2*

Figura 1.2: Distintas fotografías de mangas de langosta sudamericana en Argentina. 2017. Fuente: Senasa. *Pág. 2*

Figura 1.3: Hembra, fase solitaria. Fuente: Carbonell *et al.* (2006). *Pág. 3*

Figura 1.4: Imago (adulto inmaduro sexualmente) en fase gregaria. Fuente: Senasa. *Pág. 4*

Figura 1.5: Hembra madura sexualmente en fase gregaria. Fuente: Carbonell *et al.* (2006). *Pág. 4*

Figura 1.6: Huevos de langosta sudamericana. Fuente: Senasa. *Pág. 5*

Figura 1.7: Ninfas de langosta sudamericana. Fuente: Senasa. *Pág. 5*

Figura 1.8: Mapa de distribución de la langosta sudamericana. Adaptado de De Wisiecki y Lange (2005); Hunter y Cosenzo (1990); Wallof y Pedgley (1986). *Pág. 7*

Figura 1.9: Logo del Programa Nacional de Langostas y Tucuras del Senasa. Fuente: Senasa. *Pág. 9*

Figura 1.10: Mangas de langosta en la Argentina: a) 2017, b) 2019 y c) 2020. Fuente: Senasa. *Pág. 11*

Figura 1.11: Diagrama esquemático del actual sistema de gestión preventivo de langosta. Con esta plataforma, se toman decisiones para el control de acuerdo con las densidades de langostas. El control químico se puede implementar cuando la densidad es alta. Cuando la densidad es media, se hace una recomendación para implementar el control biológico como un aumento de la biodiversidad en el hábitat de las langostas. Fuente: Zhang *et al.* (2019). *Pág. 14*

Figura 1.12: Resumen del ciclo básico de infección descrito para *Beauveria bassiana* en invertebrados. Modificado de Mascarin y Jaronski (2016). *Pág. 21*

Figura 2.1: Foto de un ejemplar adulto de la langosta sudamericana infectadas naturalmente con el hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Santiago del Estero, Argentina. Pág. 26

Figura 2.2: Adulto de *S. cancellata* infectado con *Beauveria bassiana*. Pág. 27

Figura 2.3: Mapa con sitios de recolección de insectos y hallazgo de ejemplares de langosta sudamericana infectada naturalmente con el hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Pág. 28

Figura 2.4: Cepa LPSc 1225 de *B. bassiana*. Aspecto general y detalle de célula conidiógena holoblástica. Pág. 28

Figura 3.1: Mortalidad acumulada (%) \pm desvío estándar de ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* dentro de los 10 días posteriores a la inoculación con 1×10^4 ; 1×10^6 y 1×10^8 conidios / ml de *Beauveria bassiana* (LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227). Letras distintas indican diferencias significativas para las diferentes concentraciones (conidios/ml), de acuerdo con Tukey test ($P= 0.05$). Pág. 35

Figura 3.2: Curvas de sobrevivencia sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* cuando sobre las mismas fue aplicada una concentración de 1×10^8 conidios/ml de cada una de las cepas de *B. bassiana* LPSc 1225; LPSc 1226 y LPSc 1227. Pág. 36

Figura 3.3: Curvas de sobrevivencia sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* cuando sobre las mismas fue aplicada una concentración de 1×10^6 conidios/ml de cada una de las cepas de *B. bassiana* LPSc 1225; LPSc 1226 y LPSc 1227. Pág. 37

Figura 3.4: Curvas de sobrevivencia sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* cuando sobre las mismas fue aplicada una concentración de 1×10^4 conidios/ml de cada una de las cepas de *B. bassiana* LPSc 1225; LPSc 1226 y LPSc 1227. Pág. 37

Figura 5.1: Bandas de *S. cancellata* en 2019. en la localidad Campo Durán, Departamento General José de San Martín, provincia de Salta. Pág. 43

Figura 5.2: a) Instrumental utilizado para la colecta de ninfas y armado de jaulas. b) Jaulas de aluminio y c) Ninfas de *S. cancellata* de tercer estadio. Pág. 45

Figura 5.3: Aplicación con motomochila sobre jaulas con ninfas de langosta sudamericana. Pág. 45

Figura 5.4: Porcentaje de mortalidad producido por el formulado fúngico sobre ninfas de tercer estadio de la langosta sudamericana *S. cancellata*, al cabo de catorce días. Pág. 46

ABREVIATURAS

ACB: Agentes de Control Biológico

ANOVA: análisis de la varianza

APG agar papa glucosado

Ca²⁺: calcio

cc: centímetro cubico

cm: centímetro

CL₅₀: concentración letal 50

D: dia

° C: grados centígrado

gl: grados de libertad

Ha: hectárea

HR: humedad relativa

km: kilómetros

Km²: kilómetro cuadrado

L:O: luz - oscuridad

MIP: Manejo Integrado de Plagas

Mg²: magnesio

mm: milímetro

ml: mililitro

N: noche

Nº: número

NaClO: hipoclorito de sodio

p: probabilidad

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

TMS: tiempo medio de supervivencia

μl: microlitro

RESUMEN

Las langostas son plagas muy temidas debido a su capacidad de formar mangas voraces que causan daños considerables a los cultivos. La langosta sudamericana *Schistocerca cancellata* ha representado históricamente el mayor problema para la actividad agropecuaria de la Argentina, provocando graves pérdidas económicas. Desde 2015 y luego de 60 años de recesión, ha habido un resurgimiento de *S. cancellata* que afecta a la Argentina, Bolivia y Paraguay. Además de responder a situaciones de emergencia, las plagas de langostas se gestionan a nivel mundial en el marco de un manejo preventivo, que consta de la vigilancia permanente y el control temprano. En la Argentina los productos fitosanitarios de síntesis química siguen siendo el único medio disponible para el control de langostas. Sin embargo, existen antecedentes en otros países que consideran al control biológico como una estrategia insecticida fundamental. En ese sentido, el objetivo de este estudio es validar el empleo de hongos entomopatógenos para reducir de forma eficaz la población de *S. cancellata*, aportando una nueva alternativa de bajo impacto ambiental para el manejo de la plaga. En este trabajo se realizó una prospección de hongos entomopatógenos que afecten naturalmente a *S. cancellata*, dando como resultado la detección, aislamiento e identificación de tres aislados de *Beauveria bassiana*: LPSc 1225, 1226 y 1227. La identificación morfológica fue corroborada mediante la utilización de técnicas moleculares. Mediante ensayos de laboratorio se analizó la eficacia de las tres cepas y se determinó la relación entre sus niveles de quitinasas, proteasas y lipasas a diferentes temperaturas y las actividades insecticidas de estos hongos. Debido a los resultados obtenidos, se seleccionó la cepa LPSc 1227 para realizar una evaluación preliminar en condiciones de campo obteniendo una mortalidad promedio en los insectos tratados del 62,4%. En este trabajo se lograron aislar por primera vez cepas nativas de *B. bassiana* afectando naturalmente a *S. cancellata*. Este estudio ha proporcionado información valiosa sobre el potencial de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico de langostas y se deberá continuar investigando sobre la viabilidad de su aplicación en el manejo de la plaga.

ABSTRACT

Locusts are highly feared pests due to their ability to form voracious swarms that cause considerable damage to crops. The South American locust (*Schistocerca cancellata*) has historically represented the biggest problem for agricultural activity in Argentina, causing serious economic losses. Since 2015 and after 60 years of recession, there has been a resurgence of *S. cancellata* that affects Argentina, Bolivia and Paraguay. In addition to responding to emergency situations, locust pests are managed globally within the framework of preventive management, consisting of permanent surveillance and early control. In Argentina, phytosanitary products of chemical synthesis continue to be the only means available for the control of locusts. However, there are antecedents in other countries that consider biological control as a fundamental insecticidal strategy. In this sense, the objective of this study is to validate the use of entomopathogenic fungi to effectively reduce the population of *S. cancellata*, providing a new alternative with low environmental impact for the management of the pest. A prospection was carried out in search of entomopathogenic fungi that naturally affect *S. cancellata*, resulting in the detection, isolation and identification of three isolates of *Beauveria bassiana*: LPSc 1225, 1226 and 1227. The morphological identification was corroborated by using molecular techniques. Through laboratory tests, the efficacy of the three strains was analyzed and the relationship between their levels of chitinases, proteases and lipases at different temperatures and the insecticidal activities of these fungi was determined. Due to the results obtained, the LPSc 1227 strain was selected for a preliminary evaluation under field conditions, obtaining an average mortality of 62,4% in the treated insects. In this work, it was possible to isolate for the first time native strains of *B. bassiana*, naturally affecting *S. cancellata*. This study has provided valuable information on the potential of entomopathogenic fungi as biological control agents for locusts and further research on the feasibility of their application in pest management should be continued.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Características generales de las langostas

A nivel mundial, de acuerdo a Cullen y colaboradores (2017), existen 22 especies de langostas distribuidas en todos los continentes, excepto la Antártida, de un total de 7800 especies de acridoideos descritas (Simpson y Sword, 2009).

Uno de los fenómenos biológicos más característicos de las langostas y tucuras es la ocurrencia de explosiones poblacionales (“outbreaks”), aunque diferenciadas unas de otras por una serie de características propias. La diferencia entre las especies de langostas y tucuras no está dada a nivel taxonómico, sino que las langostas, como la langosta sudamericana *Schistocerca cancellata* (Serville, 1838) (Orthoptera: Acrididae), tienen la capacidad de presentar una forma peculiar de plasticidad fenotípica, conocida como polifenismo de fases denso-dependiente (Cigliano *et al.*, 2014). Los cambios en la densidad poblacional local provocan el desarrollo de formas fenotípicas llamativamente diferentes o “fases”. En condiciones de bajas densidades poblacionales se manifiesta la fase “solitaria” críptica, mientras que en condiciones de hacinamiento surge la fase migratoria “gregaria”. Por lo tanto, dentro de una misma especie de langosta existen generaciones de individuos que se diferencian no sólo en su morfología, sino también en su comportamiento, selección de alimento y fisiología nutricional, metabolismo, neurofisiología, endocrinología, biología molecular, respuestas inmunes, longevidad y producción de feromonas (Uvarov, 1977; Simpson y Sword, 2009; Cigliano *et al.*, 2014; Pocco *et al.*, 2019) (Figura 1.1).



Figura 1.1: Ninfas de langostas *Schistocerca cancellata* en distintas fases. Jujuy Argentina. 2018.

Las langostas tienen la capacidad de agregarse activamente para formar agrupamientos, mangas o enjambres, lo que sumado a su capacidad de dispersión (hasta 150 km/día), alta capacidad reproductiva y voracidad, las posiciona como una de las plagas más temidas. Su acción devastadora está relacionada principalmente con la formación de mangas que se desplazan rápidamente a áreas que no estaban infestadas dañando en poco tiempo los pastos y cultivos (Barrientos Lozano, 1992; Medina, 2016; Magor *et al.*, 2008) (Figura 1.2).



Figura 1.2. Distintas fotografías de mangas de langosta sudamericana en Argentina. 2017. Fuente: Senasa.

1.2 Identificación de la langosta sudamericana *Schistocerca cancellata*

La especie *S. cancellata* es un insecto de gran tamaño (♂ = 28 - 49 mm, ♀ = 39 - 66 mm), que presenta una coloración general castaña. La parte dorsal de la cabeza presenta una banda color crema que se extiende a lo largo del pronoto y las tegminas. Estas últimas poseen manchas castaño oscuras. El fémur posterior tiene una banda blanca en la mitad inferior de la cara externa y las tibias posteriores muestran la superficie dorsal violácea, con espinas blancas de puntas negras (De Wysiecki y Lange, 2005; Cigliano *et al.*, 2014) (Figura 1.3). Cuando las langostas están en estado gregario e inmaduro sexualmente presentan una coloración rojiza (Figura 1.4). Asimismo, a medida que los adultos avanzan en la madurez sexual se observa una coloración amarillenta (Figura 1.5).



Figura 1.3. Hembra, fase solitaria. Fuente: Carbonell *et al.* (2006).



Figura 1.4: Imago en fase gregaria. Fuente: Senasa.



Figura 1.5. Hembra en fase gregaria. Fuente: Carbonell *et al.* (2006)

1.3 Aspectos generales de la biología de *S. cancellata*

En lo que respecta a su desarrollo embrionario, se puede decir que el mismo es continuo (sin diapausa) y depende de la temperatura del suelo circundante ya que, a mayor temperatura el tiempo de incubación de los huevos se reduce (Symmons y Cressman, 2001). Es muy variable en cuanto a su extensión y existen registros desde 10 hasta 60 días (COPR, 1982). Bajo condiciones controladas de laboratorio (30 °C, 14D:10N), el desarrollo embrionario promedia los 15 días (Sánchez *et al.*, 1997). En lo que respecta al número de posturas por hembra y al número de huevos por postura son también muy variables. Se han llegado a citar hasta 24 posturas por hembra en laboratorio (Köhler, 1982) y entre 50 y 207 huevos por postura (Figura 1.6). En laboratorio, se registra una fecundidad promedio de 161 huevos/hembra con un número de huevos promedio por postura de 73 (Sánchez *et al.*, 1997; de Wysiecki y Lange, 2005). Históricamente, se aceptaron cinco estadios ninfales en el desarrollo de *S. cancellata* (Figura 1.7), requiriendo desde 36 a 57 días para llegar a adulto en condiciones naturales. Sin embargo, en estudios realizados bajo condiciones controladas de laboratorio se

registraron seis estadios ninfales, insumiendo en el último caso un promedio de 33 días para llegar a imago (Sánchez *et al.*, 1997). El adulto puede llegar hasta los cinco o seis meses de vida, mostrando un período muy variable para alcanzar la madurez sexual, desde días (generación primaveral) hasta meses (generación estival), permaneciendo en este último caso en lo que se ha considerado un estado de diapausa reproductiva.



Figura 1.6: Huevos de langosta sudamericana. Fuente: Senasa.

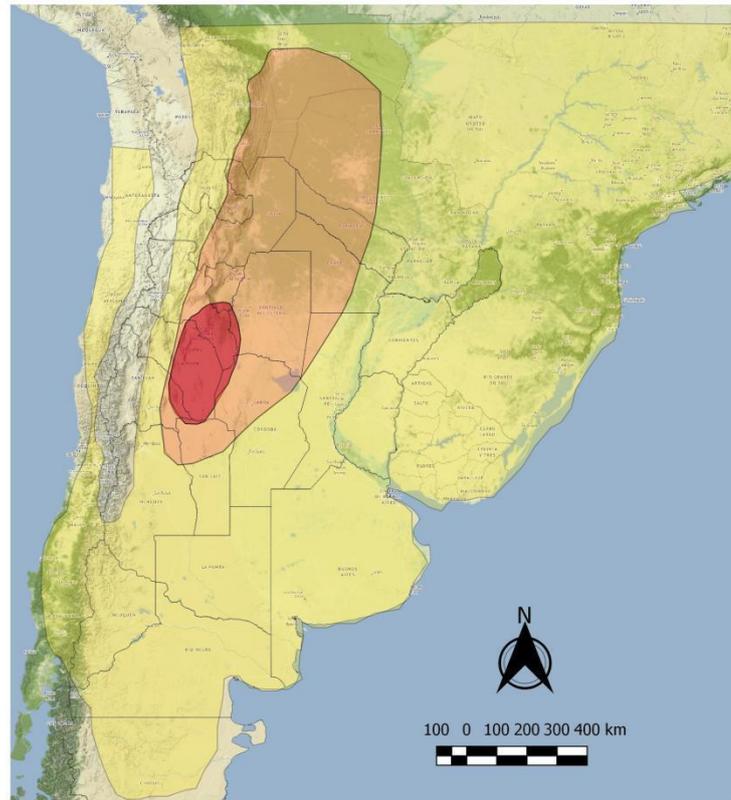


Figura 1.7: Ninfas de langosta sudamericana. Fuente: Senasa.

1.4 Distribución e importancia histórica de la langosta sudamericana

Las langostas y tucuras están entre las plagas agrícolas más peligrosas a nivel mundial. Debido al daño que pueden ocasionar, su control es crítico para la seguridad alimentaria en todo el mundo, y muchas veces requiere participación gubernamental e internacional (Zhang *et al.*, 2019). La langosta sudamericana, *S. cancellata*, ha sido históricamente considerada como la plaga agrícola más grave en la Argentina (Kohler, 1962; Gastón, 1969; Medina *et al.*, 2017). Esta especie presenta una amplia distribución geográfica en Sudamérica que abarca el centro y norte de la Argentina, la totalidad de Uruguay y Paraguay, el Sur de Brasil, el Sudeste de Bolivia y el centro y norte de Chile. Esta extensa distribución (casi 4.000.000 Km²) corresponde, a excepción de Chile (donde *S. cancellata* permanece en fase solitaria), al área de máxima invasión histórica, que es aquella en donde la plaga alcanzó su mayor área de dispersión (Waloff y Pedgley, 1986). El área de recesión, que es aquella en donde se encuentran langostas en momentos sin estallidos poblacionales y que coincide con el área acridiógena de Barrera y Turk (1983), abarca una superficie de aproximadamente 900.000 Km² que se extiende como una cuña desde el sudeste de Bolivia y oeste de Paraguay hasta el noreste de la provincia argentina de Mendoza. El área de brote en donde, según la bibliografía ocurren las explosiones poblacionales, es mucho menor, extendiéndose como un óvalo por el centro-sudeste de las provincias de Catamarca y La Rioja, Este de San Juan, Noreste de San Luis y Córdoba, y el sudoeste de Santiago del Estero (Fig. 1.8) (Waloff y Pedgley, 1986; Hunter y Cosenzo, 1990; de Wysiecki y Lange, 2005). Dado el último resurgimiento, que se inició en el 2015, distintos especialistas de la región discuten sobre la posibilidad de la existencia de otras áreas de brotes ubicadas fuera de la Argentina.

DISTRIBUCIÓN DE LA LANGOSTA SUDAMERICANA



Áreas de distribución

	Área de Máxima Invasión	Ing. Agr. Héctor E. Medina
	Área Acridiogená	Adaptado de: De Wysiecki & Lange, 2005 Hunter & Cosenzo, 1990 Waloff & Pedgley, 1986
	Área de Brotes	

Figura 1.8. Mapa de distribución de la langosta sudamericana.

En el área afectada de la región de Sudamérica, el mayor impacto y las mayores pérdidas económicas desde 1800 hasta 1954 han estado en la Argentina (Kölher, 1962; Lieberman, 1972; Medina *et al.*, 2017) donde prácticamente ningún cultivo durante ese lapso escapó de las mangas de langostas (de Wysiecki y Lange, 2005). En los periodos de mayor invasión, la plaga afectó a 15 de las 22 provincias argentinas (Hunter y Cosenzo, 1990; Pocco *et al.*, 2019) y el último ataque importante del siglo XX, debido a la dispersión y daños provocados, tuvo lugar entre 1943 y 1955 (Gastón, 1969; Waloff y Pedgley, 1986).

La problemática originada por estos insectos dio lugar en nuestro país a las primeras acciones oficiales en materia de Sanidad Vegetal que datan de 1850, cuando el

gobernador de Entre Ríos, Justo José de Urquiza dispone una Resolución¹ acerca de las “medidas que deben tomarse para la extirpación de la Langosta”. En ese dictamen ya se vislumbraban los perjuicios ocasionados por la plaga.

A nivel Nacional el primer organismo de “Lucha contra la langosta” fue la Comisión Nacional de Extinción de la Langosta creada por Ley N° 2792 en 1891, durante la presidencia de Carlos Pellegrini. En 1898 durante la presidencia de José E. Uriburu se designa una nueva Comisión Nacional Central de Lucha, reemplazada en 1912 por la Dirección General de Defensa Agrícola, denominándose posteriormente y hasta 1932 Dirección General de Agricultura y Defensa Agrícola. Finalmente, la misma se convirtió en la Dirección de Defensa Agrícola y Sanidad Vegetal. Cabe destacar que la mayor parte del presupuesto de la Dirección de Defensa Agrícola se destinó a la acción contra la langosta. Queda explícita entonces la importancia de la “Lucha antiacridiana” en la iniciación de los Servicios Oficiales de Protección Vegetal de alcance federal (Tranchini, 1995). En 1945 se crea el Servicio de Lucha contra la Langosta, que posteriormente se convirtió en la Dirección de Acridiología. La Dirección continuó hasta 1991 y a partir de la creación del Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal –IASCaV- (Decreto N° 2266/1991), las actividades relacionadas con los Acridios quedaron en la órbita del Ministerio de Agricultura pasando luego al Senasa - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria- (Decreto N° 1585/1996) (Tranchini, 1995). Actualmente las acciones de lucha contra la langosta se enmarcan en el “Programa Nacional de langostas y tucuras” (PNLyT) del Senasa, a través de la Resolución Senasa N° 758/2017² y sus modificatorias (Figura 1.9). El PNLyT tiene como objetivo disminuir el daño producido por las plagas pertenecientes a las especies perjudiciales de langostas y tucuras, dentro de una estrategia de manejo preventivo.

¹Resolución del 2 de diciembre de 1850. Paraná, Entre Ríos. Ministro Secretario General del Gobierno de Entre Ríos José Miguel Galán.

² Resolución Senasa 758/2017. Se crea el Programa Nacional de langostas y tucuras en el ámbito de la Dirección Nacional de Protección Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa)



Figura 1.9. Logo del Programa Nacional de Langostas y Tucuras del Senasa. Fuente: Senasa

Gastón (1969), categoriza los esfuerzos de control de la plaga en la Argentina en tres etapas en la historia:

- 1^{er} Período o de Lucha Defensiva (1897 a 1940): en esta etapa no se conocían procedimientos de “lucha” con resultados positivos para controlar la plaga y evitar sus perjuicios socioeconómicos.
- 2^{do} Período o de Lucha Ofensiva (1944 a 1954): etapa en la cual a pesar de que los medios de lucha habían mejorado, con la incorporación de algunos productos químicos, la alta densidad y dispersión de la plaga superaron las posibilidades de control y la langosta afectó severamente a gran parte del país.
- 3^{er} Período o de Lucha Preventiva (desde 1954 hasta la actualidad): en esta etapa el control se centró en los focos incipientes de estadios juveniles de la plaga -no gregarizados-. Actualmente la estrategia está basada en la prospección, monitoreo continuo y el control de focos enmarcados en una visión holística.

1.5 Resurgimiento de la plaga en el periodo 2015 - 2020

Luego de seis décadas de actividad limitada de *S. cancellata*, con sólo tres brotes pequeños en los años 1961, 1989 y 2010 (Barrientos Lozano, 2011; Medina, 2014), se produjo un aumento poblacional importante de esta especie en el año 2015, que continúa hasta la actualidad alcanzando un nivel de infestación que amenaza la producción agropecuaria de varios países de Sudamérica. El primer brote en la Argentina fue en julio de 2015, donde se detectaron mangas de langosta de hasta 25 km² en la provincia de Santiago del Estero. El resurgimiento de esta plaga en la Argentina fue seguido por brotes de bandas de ninfas, las cuales son grupos muy numerosos de ninfas que marchan en forma conjunta, y mangas de adultos en el sureste de Bolivia, las que atacaron a más de 10.000 ha de cultivos de soja, maíz, sorgo, maní y cítricos. Las

primeras mangas fueron detectadas en enero de 2017 en el Departamento Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Unas semanas después de los reportes de Bolivia, informes similares aparecieron en Paraguay. Las mangas se concentraron en el departamento Alto Paraguay y Boquerón (Medina *et al.*, 2017). En junio de 2017 se produjo una nueva invasión de langostas a nuestro país, proveniente mayormente de Paraguay, que dio lugar a la declaración de una Emergencia Fitosanitaria por parte del Senasa a través de la Resolución 438/2017. La plaga alcanzó grandes dimensiones llegando a la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, determinando un área que alcanzó los 400.000 km² (Medina y Trumper, 2018).

En 2019 vuelven a ingresar a la Argentina mangas migratorias por las fronteras de las provincias de Formosa y Salta. A mediados de mayo de 2020 se produce un nuevo ingreso desde Paraguay de un enjambre de langostas que luego de pasar por las provincias de Formosa, Chaco y Santa Fe, ingresó a la provincia de Corrientes (luego de 73 años sin reportes de mangas en esta provincia) y avanzó finalmente hacia Entre Ríos, provincia en la cual se logró controlar la plaga a 20 km de la frontera con Uruguay (Figura 1.10). Siete años después del resurgimiento, la plaga continúa amenazando a la región de sudamérica. Actualmente existen declaradas emergencias fitosanitarias por la plaga de la langosta sudamericana en la Argentina a través de las Resoluciones Senasa N° 438/2017³ y N°1033/2019⁴, en Bolivia a través de la Resolución Administrativa del Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria (Senasag) 26/2020, en Paraguay por la Resolución del Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (Senave) N° 41/2020, en los Estados Rio Grande do Sul y Santa Catarina de Brasil declaradas por el Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a través de la ordenanza N° 201/2020 de Brasil, y asimismo Uruguay emitió una alerta a través del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca⁵. Queda en evidencia que la situación de la región respecto a esta plaga es compleja y está siendo

³Resolución Senasa N° 438/2017.Langosta sudamericana (*Schistocerca cancellata*, Serv.). Emergencia Sanitaria. Declárase la Emergencia Fitosanitaria hasta el día 31 de agosto del año 2019, con respecto a la plaga langosta comúnmente denominada sudamericana (*Schistocerca cancellata*, Serv.) en todo el territorio Nacional, debiendo adoptarse y/o fortalecerse las tareas de control, prevención Y vigilancia consecuentes a la misma

⁴ Resolución Senasa N° 1033/2019. Prórroga de Emergencia Fitosanitaria respecto a la plaga langosta comúnmente denominada sudamericana (*Schistocerca cancellata*, Serv.) hasta el 31 de agosto del año 2021.

⁵<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/mgap-exhorta-mantenerse-alerta-ante-avistamiento-langostas-reportarlo>

contenida gracias al esfuerzo conjunto de varias naciones para combatirla y minimizar su impacto en la producción agropecuaria.



Figura 1.10: Mangas de langosta en la Argentina en distintos periodos: a) 2017 b) 2019 y c) 2020. Fuente: Senasa.

1.5.1 Hipótesis sobre el resurgimiento

Existen diversas hipótesis sobre el resurgimiento de la plaga que afecta a varios países de la región, poniendo fin a un periodo de 60 años de recesión. La principal es la influencia de las precipitaciones sobre ciertos parámetros demográficos y la duración de la diapausa reproductiva invernal (Medina y Trumper, 2018). Inviernos benignos y con precipitaciones mayores al promedio permitieron que esta especie bivoltina (dos generaciones por año), desarrolle una tercera generación durante el invierno tras interrumpirse la diapausa. La ocurrencia de una tercera generación en nuestro país está directamente relacionada con explosiones poblacionales, según un trabajo de Hunter y Cosenzo (1990) en el cual documentaron que las plagas se originaron en años donde

ocurría un invierno con lluvias mayores a los promedios para la época, lo que permitía que se originen tres generaciones anuales. Una vez iniciado el estallido poblacional, los niveles de plaga continuaban en aumento durante 8 a 15 años, y su declinación era gradual y resultaban de una combinación de varias estaciones con sequía donde tenía lugar una sola generación por año (Barrientos Lozano, 2011; Medina, 2016). Por otro lado, también cobra vigor la hipótesis del efecto financiero: periodos de larga recesión afectan negativamente a las acciones de vigilancia permanente en cuanto a la intensidad y superficie monitoreada, impactando en la detección de bandas y mangas (Medina y Trumper, 2018). La gestión que se estableció en la Argentina entre las décadas de 1950 y 1960 falló sólo una vez en 60 años, sin considerar la etapa previa a 1950 cuando no existía el manejo preventivo (Gay *et al.*, 2019). Sin brotes durante años, se puede especular que la infraestructura y el capital acumulado en la década de 1950, ya sea humano, social, financiero o material, disminuyeron lentamente. Como consecuencia, cuando surgió el aumento en 2015, la combinación de cambios ambientales y debilidades institucionales condujo a un área demasiado grande para el manejo de la plaga con los recursos disponibles al inicio del brote (Medina *et al.*, 2017; Therville *et al.*, 2020).

1.6 Impacto de la plaga

Las langostas migratorias, a nivel mundial, han sido una plaga muy temida desde los comienzos de la agricultura (Harvey, 1981), ocasionando grandes pérdidas económicas (Pariona Mendoza, 2006). Una langosta de dos gramos de peso consume diariamente entre el 70% y el 100% de su peso en materia fresca (Astacio, 1987). De tal forma, considerando que en una manga de densidad media hay alrededor de 50 millones de individuos por kilómetro cuadrado, una manga de 1000 km² tiene un potencial de consumo de 100 mil toneladas de alimento por día (Barrientos Lozano, 1992).

En la Argentina las regiones del noroeste (NOA) y noreste (NEA) son las que con mayor probabilidad pueden resultar afectadas por las langostas. El valor de la producción agrícola de los principales cultivos de estas regiones ronda los USD 3.7 mil millones. Esta cifra no incluye frutales, cultivos industriales, pasturas naturales ni diversos forrajes anuales utilizados en la producción ganadera. Representa por lo tanto un “límite inferior” a la “producción sujeta a riesgo” (IICA, 2020). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2013) indica que las

mangas de langostas pueden destruir hasta el 100% de los cultivos de comunidades completas, como ocurrió entre los años 2003-2005 cuando una gran ola de langostas del desierto arrasó entre el 30% y 100% de los recursos agropastoriles en los países del Sahel en África Occidental, afectando a más de 8 millones de personas.

1.7 Control de langostas

Las pérdidas debidas a langostas y tucuras no se limitan solo al daño a los pastos y cultivos, sino que la rápida pérdida de la cubierta vegetal puede provocar como consecuencia la erosión del suelo y un aumento de la escorrentía. Asimismo, los brotes de langostas destruyen las fuentes de alimentos para muchos animales y por lo tanto afectan la biodiversidad (Latchininsky, 2008). Esta biodiversidad también puede verse afectada por los programas de control a gran escala, que no discriminan los insectos blanco de los que no lo son (Farrow, 1979; Samways y Lockwood, 1998; Samways, 2000; Smith *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2019).

Para poder contener la situación cuando se alcanza el nivel de plaga que determina la declaración de emergencias, como ocurre actualmente en varios países de Sudamérica, se requiere implementar acciones urgentes tendientes a disminuir los niveles poblacionales y minimizar los daños. No obstante, para evitar llegar a niveles poblacionales críticos de langostas, se debe implementar una estrategia de manejo preventivo sostenible en el tiempo. La estrategia de control preventivo de plagas consiste en localizar y controlar las langostas que comienzan a cambiar de individuos solitarios a gregarios (Gay *et al.*, 2015). El reconocimiento del daño y las consecuencias socioeconómicas producidas por las langostas, y algunos brotes de tucuras, han llevado a un cambio de paradigma, cada vez mayor, desde la protección de cultivos (manejo curativo) a la gestión preventiva (manejo preventivo). En bajas densidades, sin estados gregarios que causen daños, las langostas y los saltamontes son un componente esencial de un ecosistema sano de pastizales (Belovsky, 2000), ya que estimulan el crecimiento de las plantas y participan en el ciclo de los nutrientes y la cadena alimentaria (Latchininsky *et al.*, 2011). Por lo tanto, el manejo no pretende erradicarlos, sino disminuir sus densidades por debajo de los umbrales de daño económico. Una estrategia de manejo preventivo eficaz se basa en un mejor conocimiento de la biología y ecología de las plagas y en técnicas de monitoreo y control más eficientes (Zhang *et al.*, 2019).

Zhang *et al.* (2019) mencionan que existe un significativo y constante progreso a nivel mundial en el manejo de langostas, siendo más eficiente y preciso con énfasis en el cuidado del medio ambiente. Los autores proponen un diagrama esquemático del actual sistema de gestión preventiva de la langosta que se muestra en la Figura 1.11, en donde se puede observar la importancia del control biológico en el manejo de la plaga.

El control químico se puede implementar cuando la densidad de la langosta es alta, sin embargo, cuando la densidad es media o en áreas ambientalmente sensibles, se recomienda la utilización del control biológico. En la Argentina, si bien la estrategia de manejo preventivo se implementa desde el año 1954 (Gastón, 1969), actualmente se carece de la herramienta de control biológico.

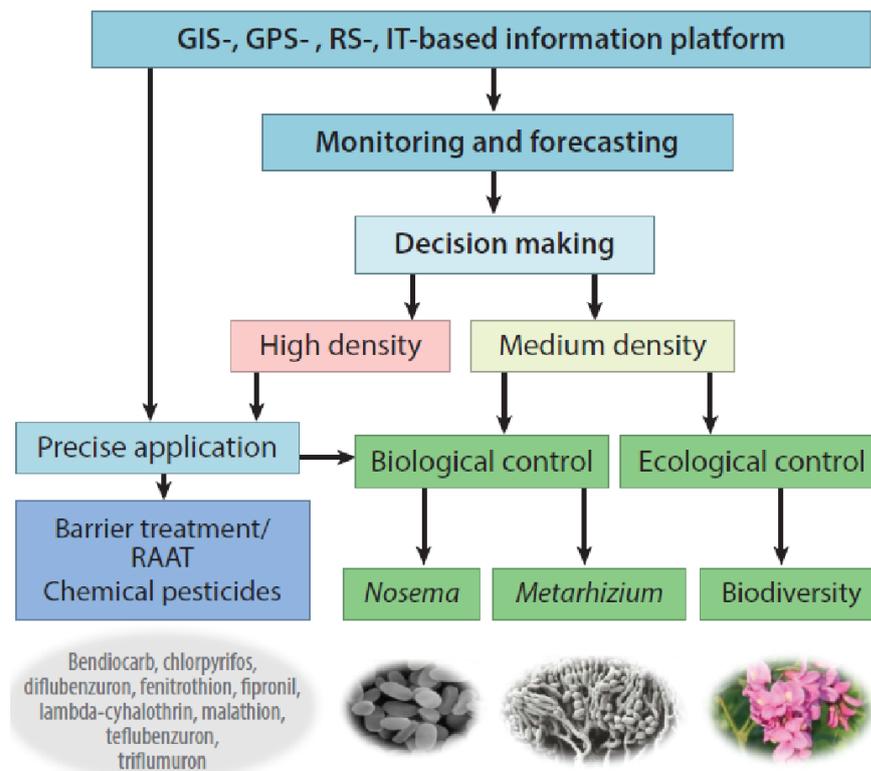


Figura 1.11: Diagrama esquemático del actual sistema de gestión preventiva de langosta. Con esta plataforma, se toman decisiones para el control de acuerdo con las densidades de langostas. El control químico se puede implementar cuando la densidad es alta. Cuando la densidad es media, se hace una recomendación para implementar el control biológico como un aumento de la biodiversidad en el hábitat de las langostas. Fuente: Zhang *et al.* (2019).

1.8 Productos fitosanitarios contra langostas, a base de Agentes de Control Biológico (ACB) en la Argentina

Hasta el momento el único medio de control de este acridio en nuestro país es mediante la utilización de insecticidas químicos. Si bien estos productos han alcanzado un gran

éxito comercial, cada vez existen más restricciones para su uso, debido a la escasa selectividad, toxicidad y bioacumulación que traen aparejadas (Lahr *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Story y Cox, 2001; González *et al.*, 2010). Actualmente los únicos principios activos registrados, ante el Senasa, son el Acefato y Carbaryl, pero debido a la situación de emergencia por la resurgencia de la plaga Senasa ha autorizado, de forma excepcional y por tiempo limitado, el uso de los principios activos Deltametrina, Cipermetrina, Lambdacialotrina, Fipronil y Diflubenzuron⁶⁷⁸.

El aumento de la conciencia ecológica de la población, ha generado incremento en la demanda de bioplaguicidas, que son productos basados en organismos benéficos o los metabolitos derivados de los mismos.

Ante la falta de insecticidas de bajo impacto ambiental para el control de langostas, es imprescindible contar con alternativas de manejo para una agricultura sustentable. En la actualidad, las investigaciones en cuanto al control de acridoideos se deberían enfocar en el marco del Manejo Integrado de Plagas (MIP), en el cual el control biológico constituye una alternativa de gran importancia (Wright *et al.*, 2014). En la Argentina las primeras referencias sobre hongos entomopatógenos corresponden a la especie *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) en larvas de coleópteros (Spegazzini, 1880) y de *Cordyceps unilateralis* (Tul. & C. Tul.) Sacc. (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) en hormigas (Spegazzini, 1913). En lo que respecta a hongos entomopatógenos que se han encontrado infectando naturalmente a especies de acridios plagas en la Argentina, solo se pueden mencionar los trabajos de Luna-Rodríguez y Lecuona (2005), quienes hallaron ejemplares adultos de *Dichroplus elongatus* (Giglio-Tos) y *Rhammatocerus pictus* (Bruner), infectados con el hongo entomopatógeno *B. bassiana*, en las localidades de General Villegas (Buenos Aires) y Rafaela (Santa Fe), respectivamente. Por otro lado, Pelizza *et al.* (2010) reportaron cinco nuevos registros de *B. bassiana* en los acridios argentinos *D. pratensis* (Bruner), *Cocytotettix intermedia* (Bruner), *Ronderosia bergi* (Stål) y *Scotussa lemniscata* (Stål), todos ellos encontrados en localidades de Buenos Aires y La Pampa. El único hallazgo,

⁶Resolución Senasa N° 438/2017.Langosta sudamericana (*Schistocerca Cancellata*, Serv.). Emergencia Sanitaria. Declárase la Emergencia Fitosanitaria hasta el día 31 de agosto del año 2019, con respecto a la plaga langosta comúnmente denominada sudamericana (*Schistocerca Cancellata*, Serv.) en todo el territorio Nacional, debiendo adoptarse y/o fortalecerse las tareas de control, prevención Y vigilancia consecuentes a la misma

⁷ Resolución Senasa N° 1033/2019. Prórroga Emergencia Fitosanitaria por langosta sudamericana.

⁸ Resolución Senasa N° 556/2021. Prórroga hasta el 31 de agosto de 2023 la autorización del uso de principios activos para el control de las plagas: langosta sudamericana (*Schistocerca cancellata*), tucura quebrachera (*Tropidacris collaris*) y tucura sapo (*Bufo narinosa*)

hasta el momento, en la Argentina de hongos entomopatógenos afectando naturalmente a ejemplares adultos de la langosta sudamericana *S. cancellata* tuvo lugar en Santiago del Estero (Latitud: -27.978481, Longitud: -63.740820), el cual es parte de este trabajo y fue publicado por Pelizza *et al.* (2018). La importancia de utilizar cepas nativas para el control de plagas se debe a que permite trabajar con material adaptado al ambiente en donde se desarrolló la plaga, evitando los procesos de importación de ACB que requieren autorizaciones a fin de asegurar la identidad, condición sanitaria de los mismos y prevenir un potencial riesgo para la producción vegetal (Resolución ex SAGyPA N° 758/97)⁹.

1.9 Hongos entomopatógenos como biocontroladores de plagas

El control biológico es una parte muy importante del MIP, ya que además de cuidar y reforzar la acción de los agentes de control que normalmente están presentes en el ecosistema, utiliza agentes naturales (depredadores, parásitos, parasitoides y patógenos) para reducir la densidad de la población y los efectos de las plagas. El control de plagas utilizando patógenos, es una rama del control biológico conocida como control microbiano y hace referencia al uso de microorganismos como agentes de control, tales como bacterias, nematodos, virus, protozoos y hongos entomopatógenos (Eilenberg *et al.*, 2001; Lord, 2005; González Castillo *et al.*, 2012).

Entre los microorganismos que se utilizan para controlar a distintas especies de insectos plagas, los hongos entomopatógenos son los que han recibido mayor atención por la gran variedad de especies que presentan y la diversidad de insectos plagas a los cuales son capaces de infectar y controlar. Los hongos entomopatógenos se conocen desde hace más de dos siglos cuando en 1836 se presenta un trabajo sobre la enfermedad del gusano de seda, causada por *B. bassiana*. Este hecho marca el inicio de la patología de insectos, pero el desarrollo y aplicabilidad de estos microorganismos para el control de insectos plagas, se inicia en 1879 con Hagen (García García *et al.*, 2008). En 1878 en Rusia, Metchnikoff, utilizó al hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn (Hypocreales: Clavicipitaceae) para el control de *Anisoplia austriaca* (Herbst) (Coleoptera: Scarabaeidae) conocido vulgarmente como escarabajo

⁹Resolución ex Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación 758/97. Reglaméntese el ingreso al país de cualquier agente biológico destinado al control de plagas agrícolas.

de cereales, con este hecho Metchnikoff fue el primer investigador en utilizar un hongo como agente de control de plagas (Glare, 2004). Todos los insectos son susceptibles de ser afectados por algún hongo. Los hongos entomopatógenos se encuentran clasificados en el Reino Fungi, dentro de cinco Phyla: Microsporidia, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota. Desde el punto de vista del control de insectos plagas, el Phylum de mayor importancia es Ascomycota, ya que agrupa a la mayoría de hongos patógenos de insectos (Humber, 2012a;b). Estos hongos se caracterizan por presentar hifas septadas, poseer una fase asexual o anamórfica donde producen gran cantidad de esporas o conidios que sirven para su amplia dispersión, y una fase sexual o teleomórfica con producción de esporas que le permiten la recombinación genética. Se encuentran en la naturaleza mayoritariamente en su estado asexual o anamórfico más que en su estado sexual o teleomórfico. Actualmente, los hongos entomopatógenos más importantes del Phylum Ascomycota, se ubican en el Subphylum Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales subdividido en tres familias: 1) Clavicipitaceae (donde se han citado como patógenos los géneros *Aschersonia*, *Hypocrella*, *Metarhizium* y *Nomuraea*); 2) Cordycipitaceae (donde se hallan *Beauveria*, *Isaria* y *Lecanicillium*) y 3) Ophiocordycipitaceae (donde se encuentran los géneros *Ophiocordyceps*, *Hirsutella*, *Tolypocladium*, *Hasposporium* y *Purpureocillium*) (Sosa-Gómez *et al.*, 2010). Este grupo de hongos es cosmopolita y se conocen hasta el momento unos 100 géneros dentro de los cuales se pueden mencionar unas 700 especies (González Castillo *et al.*, 2012); entre los géneros más importantes se pueden destacar: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Tolypocladium* y *Lecanicillium* (Roy *et al.*, 2006; García *et al.*, 2008; Vega, 2008). Algunas de las ventajas que presentan los hongos entomopatógenos para ser utilizados en programas de control microbiano de insectos plagas son: alta especificidad sobre el insecto blanco, capacidad de dispersión natural, posibilidad de cultivo de manera axénica durante largos periodos de tiempo manteniendo su patogenicidad, inocuos para el hombre como para el resto de los vertebrados, capacidad de control permanente del insecto plaga una vez establecidos en el ambiente y la infección generalmente se produce por contacto, a través del tegumento, no siendo necesaria su ingesta (St. Leger *et al.*, 2011).

Finalmente, trabajos llevados a cabo por Pelizza *et al.* (2015a, 2015b), afirman que la aplicación conjunta de hongos entomopatógenos e insecticidas químicos convencionales es factible. Esto permitiría reducir las dosis de fitosanitarios de origen químico a la

mitad o incluso un 25% de la dosis recomendada por el fabricante a campo, generando un menor impacto en el ambiente.

1.10 Antecedentes de control biológico de langostas en el mundo

En África entre 1986 y 1989, se trataron 26 millones de hectáreas exclusivamente con insecticidas químicos para el control de la langosta del desierto *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera: Acrididae). Esta masiva utilización de insecticidas químicos, sumada a la resistencia a los mismos desarrollada tanto por las ninfas como por los adultos de esta especie de langosta, dio lugar a la generación del Programa LUBILOSA¹⁰ (Lutte Biologique contre les Locustes y les Sauteriaux) con apoyo de la FAO, para desarrollar un método biológico que formaría parte en un programa de manejo integrado de *S. gregaria* (Hunter, 2005; Medina, 2014). El método tuvo gran éxito con la utilización de *M. anisopliae* var. *acridum*, lo que motivó el inicio de otros estudios con aislados locales de *Metarhizium* en Australia, Brasil y México, y *Beauveria* en Canadá (Hunter, 2005). En Australia se ha obtenido el aislado FI-985 del hongo *M. anisopliae* var. *acridum* con alta eficiencia de control, lo que dio lugar al producto comercial denominado "Green Guard®", el cual fue utilizado por la Comisión Australiana para el Control de Langosta (Hunter *et al.*, 2000; Milner y Hunter, 2001).

En Brasil, se utilizó *Metarhizium* sp. para el control de la tucura *Rhamatocerus shistocercoides* (Rehn, 1906) (Orthoptera: Acrididae) en la década del 90, pero no se ha encontrado mercado para el desarrollo de un producto comercial (Magalhaes *et al.*, 2001). En China se tratan anualmente más de 1.000.000 ha con infestación de langostas y saltamontes. La especie más importante es *Locusta migratoria manilenses* (Meyen, 1835) (Orthoptera: Acrididae), muy común cerca de ríos, razón por la cual el control biológico a base de *Metarhizium* toma gran importancia, ya que se contaminaría el agua en caso de utilizar productos de síntesis química (Hunter, 2005).

¹⁰ LUBILOSA fue un programa de investigación, finalizado en el año 2002, cuyo objetivo fue desarrollar una alternativa biológica al control químico de la langosta plaga *S. gregaria*. Este nombre es un acrónimo del título en francés del programa: Lutte biologique contre les Locustes et les Sauteriaux. Durante sus trece años de existencia (noviembre de 1989 a diciembre de 2002), el programa identificó un aislamiento fúngico de un hongo entomopatógeno perteneciente al género *Metarhizium* altamente virulento para las ninfas y adultos de esta especie de langosta. Posteriormente pasó por todas las etapas necesarias para el desarrollo comercial de un bioplaguicida llamado Green Muscle, basado en las esporas del aislamiento fúngico mencionado anteriormente

1.11 Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos

El paso inicial en la infección de los insectos por medio de hongos patógenos involucra la adhesión de los propágulos infectivos (conidios o esporas) a la cutícula del insecto. El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la espora del primero es depositada en la superficie de este último. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interfase entre la espora pregerminada y la epicutícula y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración (Tanada y Kaya, 1993; Pedrini *et al.*, 2007). El proceso de adhesión de la espora a la cutícula del insecto, está mediado por la presencia de moléculas sintetizadas por el hongo denominadas adhesinas. Por ejemplo, en el entomopatógeno *M. anisopliae* se ha descrito un tipo de adhesina denominada MAP1 la cual se localiza en la superficie de los conidios (Wang y St. Leger, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que los iones divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} reducen las fuerzas de repulsión electrostáticas promoviendo la adhesión de las esporas (Pucheta Díaz *et al.*, 2006). La forma en la que los hongos entomopatógenos penetran en el insecto depende de las propiedades de la cutícula tales como el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley, 1992). Una vez establecido el proceso de adhesión, continúa la penetración, la cual es posible gracias a la acción combinada de un mecanismo físico y otro químico. El primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma inicialmente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (Monzón, 2001). Estudios *in vitro* indican que la digestión del integumento sigue una secuencia de lipasa–proteasa–quitinasa (Tanada y Kaya, 1993). Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos realizan una transición dimórfica de micelio a levadura y una vez que han evadido el sistema inmune del insecto, se produce una septicemia. La micosis induce síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por

pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Bustillo, 2001). Ya en el interior del insecto, los hongos deben enfrentarse con los mecanismos de respuesta del sistema inmune para lo cual han desarrollado estrategias defensivas e inmunosupresoras, como la producción de toxinas o cambios estructurales en su pared celular (Telléz-Jurado *et al.*, 2009). También se ha observado que, para evitar al sistema inmune del insecto, los hongos suelen prescindir de la formación de pared celular y se desarrollan como blastosporas o cuerpos hifales, evadiendo su reconocimiento por los hemocitos circulantes en el hemocele (Vinson, 1991). Cuando los nutrientes provenientes del insecto, particularmente las fuentes de nitrógeno, se van agotando las fases levaduriformes retoman su crecimiento micelar (Freimoser *et al.*, 2003). Es importante destacar que la muerte del insecto se debe a una combinación de tres factores que actúan conjuntamente: la producción de toxinas por parte del hongo, la obstrucción física de la circulación de la hemolinfa en el sistema circulatorio del insecto y la privación de nutrientes (Goettel e Inglis, 1997). Por último, cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, las hifas del hongo emergen nuevamente al exterior del cadáver del insecto, donde esporulan (Tanada y Kaya, 1993). Finalmente, la dispersión de la spora puede ser un proceso activo o pasivo y depende de las características de las esporas. Cada spora puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión (Tanada y Kaya, 1993; Mascarín y Jaronski, 2016) (Figura 1.12).

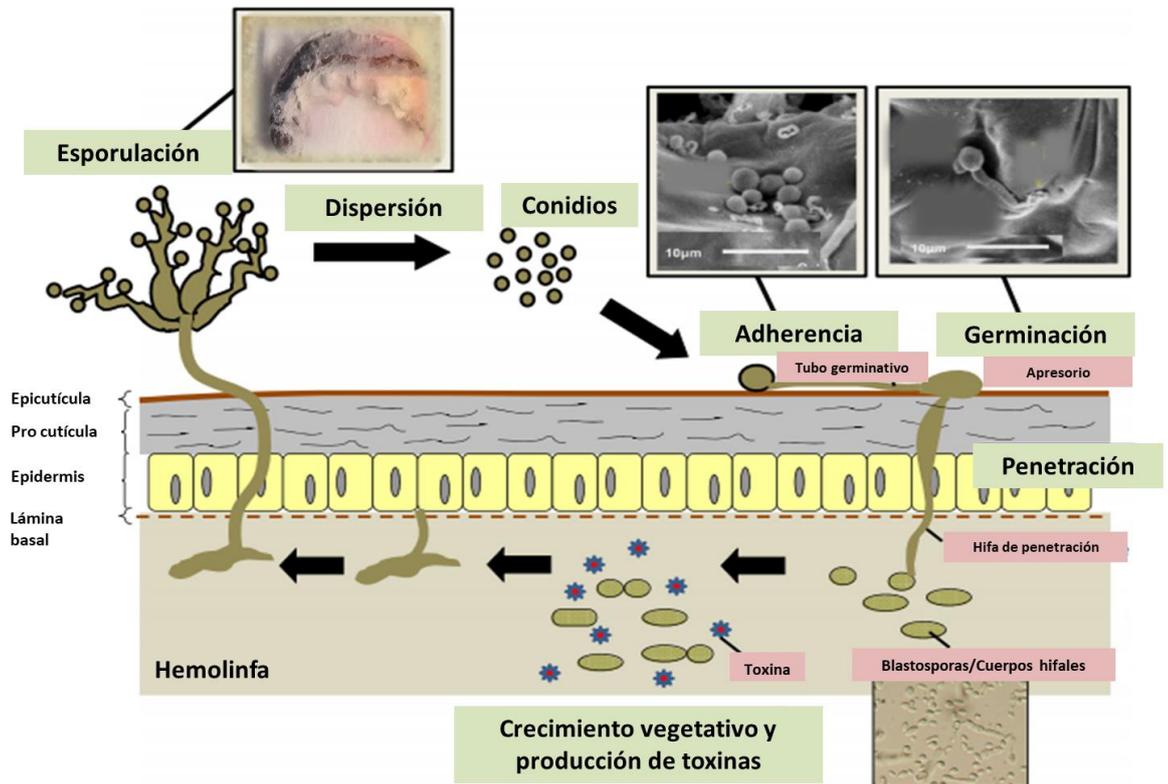


Figura 1.12: Resumen del ciclo básico de infección descrito para *Beauveria bassiana* en invertebrados.

Modificado de Mascarin y Jaronski (2016).

1.12 Objetivo general

Desarrollar una alternativa biológica, mediante la utilización de hongos entomopatógenos nativos para el control de la langosta plaga *Schistocerca cancellata*.

1.13 Objetivos específicos

- 1- Realizar la prospección, detección, recolección, aislamiento, estudio e identificación de especies de hongos entomopatógenos que afectan naturalmente a *S. cancellata*.
- 2- Evaluar bajo condiciones controladas de laboratorio, la patogenicidad y virulencia de los hongos entomopatógenos aislados a partir de la langosta sudamericana *S. cancellata*.
- 3- Determinar bajo condiciones de laboratorio, la actividad enzimática (proteolítica, lipolítica y quitinolítica) de las distintas cepas de hongos entomopatógenos aislados a partir de *S. cancellata*.

4- Evaluar de forma preliminar, en condiciones de semi-campo, el control de *S. cancellata* con las cepas seleccionadas como promisorias.

1.14 Hipótesis

Se hallarán cepas nativas de hongos entomopatógenos que infectan naturalmente a *S. cancellata*, que manifiestan efectividad en el control biológico de este insecto plaga y con potencial uso en la agricultura.

CAPÍTULO 2

Prospección, detección, estudio e identificación de especies de hongos entomopatógenos que afectan naturalmente a *Schistocerca cancellata*.

2.1 Introducción

En la Argentina, los únicos estudios acerca de la susceptibilidad de *S. cancellata* a diferentes microorganismos fueron llevados a cabo por Lange y Wittenstein (1998), Lange *et al.* (1998, 2000) y Pelizza *et al.* (2012) evaluando la patogenicidad de protozoos, virus, microsporidios y hongos entomopatógenos bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, es importante aclarar que en ninguno de estos trabajos se probaron microorganismos aislados de *S. cancellata* infectadas naturalmente. Aislar cepas nativas permitiría trabajar con microorganismos que se encuentran adaptados al ambiente en donde prospera la plaga. Debido a la resurgencia de *S. cancellata* en la región, existiendo altas poblaciones de langostas, las probabilidades de encontrar cepas de hongos entomopatógenos afectando naturalmente a los insectos podrían ser mayores si se compara con una plaga en recesión.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Sitios de muestreo

Se realizaron recolecciones de ninfas y adultos de *S. cancellata* durante los años 2016 y 2017, en 66 sitios distintos. La recolección fue realizada en las provincias de La Rioja, Santiago del Estero, Catamarca y Córdoba en zonas donde predominan las asociaciones vegetales de tipo xerófilo, representadas en su mayor parte por bosque espinoso de mediana altura. En estas zonas se puede encontrar el mosaico vegetal típico donde la langosta se reproduce y habita de manera permanente que está compuesto por: *Prosopis nigra* (algarrobo negro), *Prosopis alba* (algarrobo blanco), *Larrea divaricata* (jarilla macho), *L. cuneifolia* (jarilla hembra), *Gomphrena tomentosa* Giseb. (yuyo blanco), *Aspoderma quebracho-blanco* (quebracho blanco), *Zyzyphus mistol* (mistol), *Cercidum praecox* (brea), *Acacia spp.* (acacia), *Atamisquea emarginata* (atamisqui), *Cassia aphylla* (pichanilla), *Bulnesia retamo* (retamo), *Parkinsonia praecox* (brea), *Celtis*

pálida (tala) (Barrientos Lozano, 2011). Los ejemplares de ninfas y adultos fueron tomados mediante golpes o barridos con redes entomológicas, de 40 cm de diámetro y 75 cm de profundidad, a lo largo de transectas de 100 metros en cada uno de los sitios de muestreo. El método utilizado es de eficacia probada para la obtención de muestras representativas de la comunidad bajo estudio (Larson *et al.*, 1999). Las langostas recolectadas, fueron depositadas en jaulas de aluminio con tejido mosquiteros de 30 x 30 x 30 cm, trasladadas al laboratorio en el interior de vehículos con aire acondicionado para reducir el metabolismo de los insectos y lograr transportarlos de manera aletargada y que no se lastimen entre ellos. Una vez en el laboratorio, se realizó su procesamiento y búsqueda de hongos patógenos asociados a ellos.

2.2.2 Cría de insectos

Una vez que se llegó al laboratorio con los insectos recolectados, el 50% del total de los mismos, fueron clasificados en machos y hembras según su morfología. Posteriormente fueron colocados en jaulas de aluminio de 70 x 50 x 50 cm recubiertas con tejido mosquitero; en el piso de estas jaulas se colocó un recipiente plástico con una mezcla de arena y suelo estéril en su interior, para que allí las hembras pudieran oviponer. Las jaulas fueron instaladas dentro de bioterios con capacidades controladas, a una temperatura de 30 °C, fotoperiodo de 14:10 L:O y humedad relativa de 40%. Estas condiciones estimulan la cópula y posterior oviposición por parte de las hembras de *S. cancellata* (Sánchez *et al.*, 1997). Los insectos fueron alimentados diariamente con hojas de lechuga, repollo y salvado de trigo. Cada 7 días los recipientes plásticos fueron retirados del interior de las jaulas, humedecidos con agua destilada estéril y colocados en el interior de tubos de acetato de 50 x 9 cm sellados con tapa de tejido mosquitero en ambos extremos (Henry, 1985). Las ninfas de *S. cancellata* nacidas a partir de las posturas fueron criadas hasta tercer estadio y posteriormente utilizadas en los ensayos de patogenicidad. Otra parte de los insectos recolectados fueron colocados en condiciones de alta densidad, dentro de las jaulas como las mencionadas anteriormente y utilizando una jaula por cada sitio de muestreo, para estimular la expresión de las enfermedades o infecciones latentes que pudieran traer del campo (Madelin, 1963; Shah *et al.*, 1997). Los insectos que murieron bajo dichas condiciones fueron desinfectados superficialmente a través de una serie de baños consecutivos en alcohol 70% (10-15 segundos), solución de NaClO al 0.5% (1 minuto) y finalmente dos baños en agua destilada estéril (1 minuto) acorde a la técnica propuesta por Lacey y Brooks (1997).

Posteriormente los cadáveres se colocaron en cámaras de cultivo humedecidas con agua destilada estéril y se incubaron a 24 °C en oscuridad durante 3 días a fin de estimular la emersión del micelio, en caso de haber muerto por acción de hongos entomopatógenos.

2.2.3 Aislamiento de hongos entomopatógenos en laboratorio a partir del insecto infectado

Durante una acción de monitoreo de rutina, ejemplares de *S. cancellata* fueron encontrados en el campo infectados y muertos por acción de hongos entomopatógenos (Figura 2.1). Los mismos fueron recolectados, colocándolos en el interior de recipientes plásticos estériles y transportados hasta el laboratorio. Una vez allí, estos ejemplares que se encontraban cubiertos con una gran cantidad de moho sobre su superficie, fueron colocados en el interior de una cámara de flujo laminar y utilizando una aguja entomológica estéril, se procedió a inocular cajas de Petri que contenían medio de cultivo comercial agar papa glucosado (APG) (Britania SA, Buenos Aires, Argentina) a razón de 39 gramos del producto por litro de agua destilada estéril. A este medio de cultivo se le adicionó antibiótico (0,5 g de estreptomicina y 0,25 g de cloranfenicol/L), para evitar el desarrollo de bacterias contaminantes según la técnica descrita por Goettel e Inglis (1997), y Papierok y Hajek (1997). Las placas de Petri inoculadas se incubaron en estufa a 25 °C y oscuridad, durante 7 a 10 días para favorecer el desarrollo de las estructuras fúngicas reproductivas. Las colonias obtenidas fueron luego repicadas a medio de cultivo agar papa glucosado y agar Sabouraud para permitir la esporulación de los hongos y poder identificarlos mediante la observación microscópica de sus estructuras reproductivas. La identificación morfológica se realizó examinando las colonias mediante observación de estructuras reproductivas asexuales a través de microscopía óptica, claves taxonómicas y publicaciones específicas para cada grupo de hongos (Samson *et al.*, 1988; Humber, 1997; Kirk *et al.*, 2011). Para corroborar las identificaciones morfológicas se realizaron identificaciones moleculares de cada uno de los aislados fúngicos, mediante técnicas de amplificación de regiones específicas de ADN. Para ello se obtuvo ADN genómico de los cultivos monospóricos de acuerdo con Stenglein y Balatti (2006). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron realizadas en un termociclador XP (Bioer Tecnología Co, Hangzhou, China), para amplificar la región del espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr utilizando los cebadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3') e ITS4 (5'-

TCCTCCGCT TATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Las reacciones de PCR, purificaciones de fragmentos y secuenciación se realizaron según Stenglein *et al.* (2010) y Canel *et al.* (2013). Las similitudes de las secuencias obtenidas con aquellas depositadas en los bancos de genes se examinaron con la herramienta BLASTn1 disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

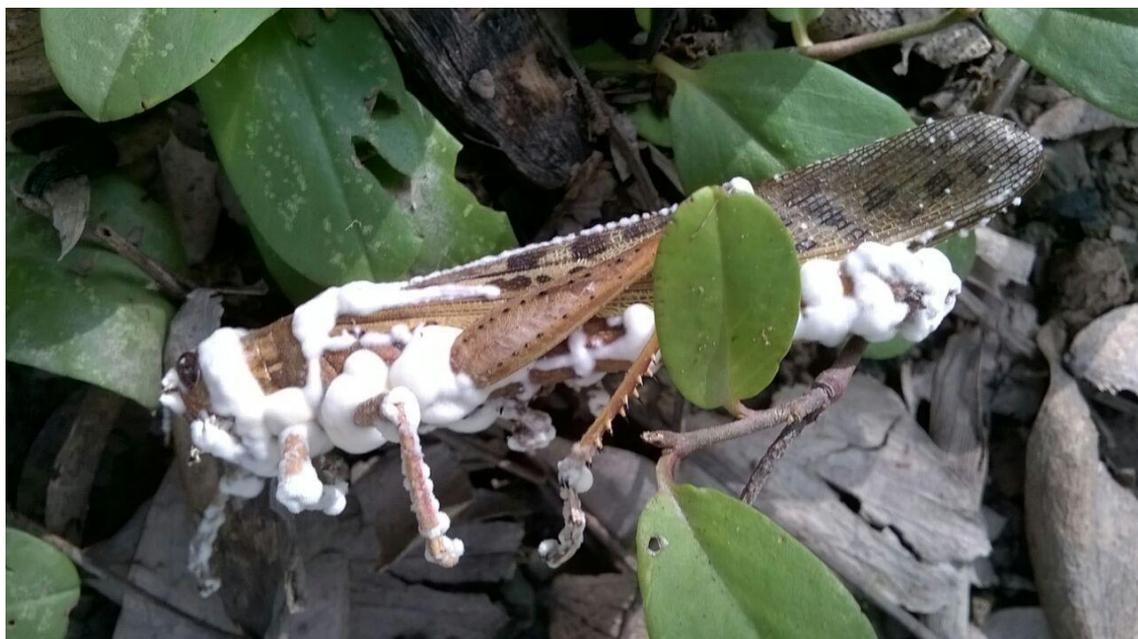


Figura 2.1: Foto de un ejemplar adulto de la langosta sudamericana infectada naturalmente con el hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Santiago del Estero, Argentina.

2.3 Resultados

No se obtuvieron aislados fúngicos a partir de las langostas recolectadas a campo y mantenidas en el laboratorio en condiciones de hacinamiento. En cambio, sí se pudieron obtener tres aislados del hongo entomopatógeno *B. bassiana* a partir de ejemplares adultos de la langosta sudamericana *S. cancellata*, hallados muertos con signos de micosis en el campo (Figura 2.2). Los hallazgos se realizaron en la provincia de Santiago del Estero (Latitud: -27.978481, Longitud: -63.740820), zona englobada dentro de la región Biogeográfica Chaqueña (Cabrera y Willink, 1973), Figura 2.3. Los aislados fueron depositados en la colección de cultivos fúngicos del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini, bajo los siguientes números de acceso: LPSc 1225; LPSc 1226 y LPSc 1227. Las características de las estructuras fúngicas observadas bajo microscopio óptico fueron coincidentes con las registradas por Humber (1997) para *B. bassiana* (Figura 2.4). Las secuencias generadas en este estudio mostraron un porcentaje

de homología con la secuencia tipo publicada por Rehner *et al.* (2011) del 98,95% para la cepa LPSc 1225; 98,77% para la cepa LPSc 1226 y de 98,95% para la cepa LPSc 1227. Las secuencias de cada una de las cepas fueron ingresadas en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (bajo los números de acceso MG012790, MG012791, y MG012792) para *B. bassiana* LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227, respectivamente.



Figura 2.2: Adulto de *S. cancellata* infectado con *Beauveria bassiana*.

SITIOS DE RECOLECCION DE INSECTOS

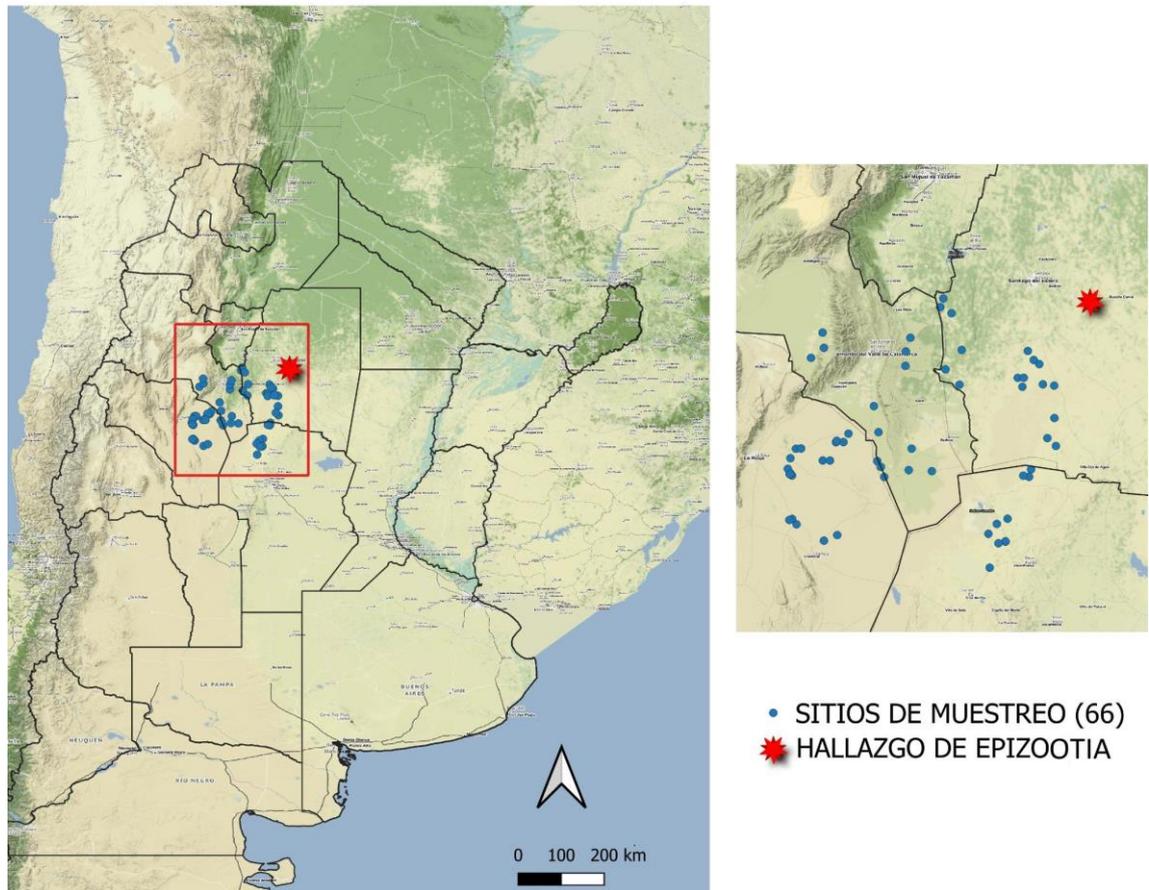


Figura 2.3: Mapa con sitios de recolección de insectos y hallazgo de ejemplares de langosta sudamericana infectadas naturalmente con el hongo entomopatógeno *B. bassiana*.



Figura 2.4: Cepa LPSc 1225 de *B. bassiana*. Aspecto general y detalle de célula conidiógena holoblástica.

2.4 Conclusiones parciales

A partir de los distintos muestreos llevados a cabo se pudieron aislar e identificar tres cepas de *B. bassiana* que se encontraban infectando naturalmente a ejemplares adultos de la langosta plaga *S. cancellata*. Siendo ésta la primera cita en Argentina de *B.*

bassiana afectando adultos de *S. cancellata*. Es importante mencionar que los insectos que fueron recolectados a campo y puestos en condiciones de estrés no desarrollaron infecciones fúngicas de entomopatógenos. Los tres aislados de *B. bassiana* anteriormente mencionadas LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227 fueron obtenidos a partir de ejemplares muertos de *S. cancellata* que ya se encontraban esporulados en el campo. El aislamiento de estos hongos entomopatógenos provenientes de infecciones naturales de individuos adultos de *S. cancellata* pone de manifiesto, la susceptibilidad de esta especie de acridio plaga al hongo entomopatógeno *B. bassiana* por primera vez en la Argentina.

CAPÍTULO 3

Evaluación bajo condiciones controladas de laboratorio de la patogenicidad y virulencia de hongos entomopatógenos aislados a partir de ejemplares parasitados de la langosta sudamericana *S. cancellata*.

3.1. Introducción

La utilización de un aislado del hongo entomopatógeno como posible controlador biológico de *S. cancellata* involucra varias etapas, entre ellas la etapa de evaluación bajo condiciones de laboratorio para poder seleccionar los candidatos más promisorios para el control de esta plaga. Dentro de esta etapa se realizan generalmente bioensayos, en la cual uno o más organismos vivos, en este caso ninfas de la langosta *S. cancellata*, son utilizados como agente de prueba para poder determinar las variables respuesta, objeto de esta investigación. En relación con el presente trabajo, la variable respuesta determinada fue la mortalidad ocasionada por los diferentes aislados *B. bassiana* contra *S. cancellata*. El desarrollo de los bioensayos requiere una comprensión profunda de los requisitos del huésped y del patógeno (Butt y Goettel, 2000). Además, la utilidad de los bioensayos recae principalmente en ser una técnica de detección relativamente simple, en relación a cantidades utilizadas y medios donde se llevan a cabo, donde las condiciones ambientales pueden o no estar controladas, sin embargo, generalmente se opta por controlar las condiciones del ambiente. El uso de bioensayos para determinar la actividad de nuevos aislados es una tarea necesaria si se quiere conocer la actividad insecticida de dichos aislados (McGuire *et al.*, 1997). En todos los bioensayos se debe incluir un control sin el inóculo fúngico, para poder determinar la supervivencia de los insectos en las condiciones de incubación posteriores a la inoculación. Como en cualquier estudio científico, todo el bioensayo debe repetirse en una fecha posterior, preferiblemente utilizando otro lote de insectos y preparación de inóculo para garantizar la reproducibilidad de los resultados y, por lo tanto, justificar las conclusiones. Aunque son útiles para proveer información valiosa sobre la interacción insecto-patógeno-ambiente, la validez de los resultados del bioensayo depende de su diseño, la ejecución del mismo, el análisis e interpretación de los resultados obtenidos. El desafío final es desarrollar bioensayos que puedan usarse para predecir la eficacia en el campo de las

cepas evaluadas (Butt y Goettel, 2000). Por otro lado, es importante poder contar con inóculos fúngicos bien desarrollados y jóvenes que puedan expresar las mejores características de las cepas, en lo que respecta a su patogenicidad y virulencia. Finalmente, otro punto a tener en cuenta es contar con una cría del insecto que se desee ensayar, para asegurarnos que los mismos se encuentren libres de enfermedades y no que provengan del campo ya que, podrían estar infectados con virus, hongos o bacterias entre otros (Butt y Goettel, 2000).

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Ensayos de patogenicidad

Los aislados de *B. bassiana* LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227, fueron incubados en APG durante diez días a 25 °C en oscuridad en una estufa de cultivo (Semedix). Los conidios producidos por cada una de las cepas fueron colectados mediante la utilización de un “rastrillo plástico” descartable (Fisherbrand[®]) y colocados en tubos de ensayo con una solución de agua destilada estéril + 0.01% (v/v) del tensioactivo Tween 80[®] (monolaurato de polioxietilen sorbitano) (Merck[®]). Para lograr una suspensión homogénea de conidios, los tubos se agitaron en vórtex durante 2 minutos. Posteriormente se filtraron a través de cuatro capas de muselina estéril para eliminar el micelio del hongo y dejar pasar solo los conidios, evitando así que se tapen los picos de los aspersores utilizados en el ensayo, y se tomó una alícuota de esta suspensión de conidios para ser cuantificada utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer) (Prior *et al.*, 1995). Las suspensiones se ajustaron para obtener tres concentraciones distintas de 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidios/ml. La viabilidad de los conidios de cada uno de los aislados fúngicos y de cada una de las concentraciones utilizadas en las pruebas de patogenicidad se determinaron luego de 24 horas, según lo descrito por Goettel e Inglis (1997). Para ello, se colocaron 800 μ l de APG, en forma de una fina capa de aproximadamente 2 mm de espesor sobre un portaobjetos (previamente esterilizado en autoclave), ubicado en el interior de una placa de Petri que contenía un disco de papel de filtro. Una cantidad de 400 μ l de cada una de las suspensiones fúngicas se sembró sobre el medio de cultivo. Luego se procedió a humedecer el papel de filtro con 1 ml de agua destilada estéril y se colocó esta placa de Petri a 24 °C en oscuridad para permitir la germinación de las esporas. Al cabo de 24 horas se contó el número de conidios germinados en relación al número total de conidios. Se consideraron conidios

germinados aquellos cuya longitud de tubo germinativo alcanzó la mitad de la longitud del mismo conidio (Lane *et al.*, 1988). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y se contaron 300 conidios en cada caso. En los ensayos de patogenicidad se realizaron tres réplicas (en diferentes fechas) de 10 ninfas de tercer estadio cada una de *S. cancellata*, las cuales fueron pulverizadas independientemente con 1 ml de cada una de las suspensiones fúngicas que contenían 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidios ml^{-1} utilizando un aspersor de vidrio de 33 cm^3 de capacidad. Este procedimiento fue llevado a cabo para cada uno de los aislados fúngicos LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227. Tres réplicas adicionales de 10 ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* cada una, fueron utilizadas como controles, las que fueron pulverizadas con 1 ml de una solución de agua destilada estéril + 0.01% [v/v] Tween 80[®] sin el inóculo fúngico. Tanto las ninfas tratadas como los controles se mantuvieron en grupos de 10 individuos dentro de tubos de acetato de 50 x 9 cm cuyos extremos fueron sellados con tejido mosquitero en ambos extremos para permitir la circulación de aire (Henry, 1985). Todos los insectos fueron alimentados diariamente con hojas de lechuga, repollo y salvado de trigo. Este ensayo fue realizado en el interior de un bioterio bajo condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo y humedad (30 °C, 14:10 h luz: oscuridad y 60% HR). Se registró la mortalidad acumulada diariamente durante un lapso de 10 días y el tiempo medio de supervivencia (TMS), de acuerdo a Kaplan Meier (XLSTAT-life, 2013). Las ninfas de *S. cancellata* muertas durante el transcurso que duró el ensayo fueron esterilizadas superficialmente y colocadas en cámara húmeda e incubadas a 25 °C en oscuridad por un periodo de 72 hs. La confirmación de la muerte causada por acción fúngica fue comprobada mediante la observación bajo microscopía óptica del micelio y los conidios del hongo que se encontraba esporulando sobre los ejemplares muertos de *S. cancellata*.

3.1.2 Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de la varianza (ANOVA), para determinar si existen diferencias significativas en lo que respecta a la virulencia de cada aislado fúngico sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata*. Para comparaciones posteriores se utilizó un test de Tukey (P= 0.05). Los análisis de varianza se realizaron con el software InfoStat 2007 (InfoStat 2001). Cuando la mortalidad producida por cada una de las cepas fúngicas sobre los insectos, a cada una de las concentraciones testeadas, fue igual o superior al 50% se estimó el Tiempo Medio de Supervivencia utilizando la función de distribución de supervivencia de Kaplan-Meier (XLSTAT-life, 2013). Se estimó el tiempo de

sobrevivida para cada cepa fúngica a cada una de las dosis evaluadas, sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata*, utilizando el software InfoStat 2007 (InfoStat 2001). Las comparaciones por pares entre las curvas de supervivencia se realizaron mediante la prueba de log-rank test. La relación entre las concentraciones de cada aislado fúngico y la mortalidad observada sobre las ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* fue demostrada utilizando el Análisis de Spearman Karber. Este análisis permite estimar la concentración letal 50 (CL₅₀), es decir, la concentración mínima para matar el 50% de la población en estudio de los aislados fúngicos con límites de confianza del 95%.

3.2 Resultados

La viabilidad promedio de los conidios luego de 24 hs, fue del 99,3% para la cepa LPSc 1227, de 97,6% para la cepa LPSc 1225 y del 95,6% para la cepa LPSc 1226. Con respecto a la virulencia de los tres aislados fúngicos testeados sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata*, *B. bassiana* LPSc 1227 causó la mayor mortalidad en cada una de las concentraciones estudiadas. Los registros de letalidad variaron desde 100% a $33.3 \pm 3.2\%$ a las concentraciones de 1×10^8 y 1×10^4 conidios/ml, respectivamente (Fig. 3.1). Por otro lado, se pudo observar que el aislado fúngico con menores porcentajes de mortalidad (sin diferencias estadísticas) sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* fue *B. bassiana* LPSc 1226, cuyos valores oscilaron entre $93,3 \pm 5,9\%$ para la concentración más alta y $10 \pm 2,3\%$ para la más baja (Fig. 3.1). Los datos analizados se ajustaron a una distribución normal. El análisis de la varianza mostró diferencias significativas en lo que respecta a la variable concentración de conidios ($F= 7,62$; $gl=2$; $P= 0,0006$), pero no se observaron diferencias significativas en la variable aislado fúngico y la interacción concentración*aislado fúngico (Tabla 3.1). Se observaron diferencias significativas (valor observado= 78,805; valor crítico= 7,815; $P<0,0001$) de acuerdo con Log-rank test, en lo que respecta al tiempo medio de supervivencia (TMS) para cada una de los aislados evaluados y dichas diferencias pueden observarse en la tabla de comparaciones múltiples (Tabla 3.3). En este sentido, se pudo observar que el aislado LPSc 1227 mostró el menor valor $6,24 + 0,23$ días para una concentración de 1×10^8 conidios/ml, seguido por el aislado LPSc 1225 con $6,89 + 0,24$ días y por último la cepa LPSc 1226 de *B. bassiana* con $8,26 + 0,22$ días para igual concentración de conidios. Nuevamente se observaron diferencias significativas (valor observado= 28,015; valor crítico= 5,991; $P<0,0001$) de acuerdo a Log-rank test, en lo que respecta

al tiempo medio de supervivencia (TMS), para cada una de los aislados evaluados y dichas diferencias pueden observarse en la tabla de comparaciones múltiples (Tabla 3.4), cuando la concentración fue reducida a 1×10^6 conidios/ml, los valores de TMS fueron de $7,82 \pm 0,51$ días para la cepa de *B. bassiana* LPSc 1227 y de $8,13 \pm 0,44$ días para la cepa LPSc 1225, no pudiéndose calcular dicho parámetro para la cepa LPSc 1226, debido a que el porcentaje de mortalidad para la concentración mencionada arriba fue inferior al 50%. Por último, no se pudo calcular el TMS para ninguno de los aislados de *B. bassiana*, cuando la concentración fue de 1×10^4 conidios/ml, debido a que la mortalidad sobre las ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* fue inferior al 50% en todos los casos. En lo que respecta al tiempo de sobrevida, se pudo observar nuevamente que los menores valores sobre ninfas de *S. cancellata* se evidenciaron para la cepa LPSc 1227 a cada una de las concentraciones evaluadas, seguida por la cepa LPSc 1225 y por último por la cepa LPSc 1226. Cuando la concentración fue de 1×10^8 conidios/ml, se pudo observar que no había ninfas que sobrevivieron al día 7 del ensayo, cuando sobre las mismas fueron aplicados los conidios de la cepa LPSc 1227 (Figura 3.2). Cuando la concentración utilizada fue de 1×10^6 conidios/ml nuevamente los menores valores de sobrevida se observaron para la cepa LPSc 1227 con un 27% de sobrevida al cabo de los 10 días que duró el ensayo. Por el contrario, los mayores valores fueron observados para la cepa LPSc 1226 con un 57% de sobrevida de las ninfas al culminar el día 9 del ensayo (Figura 3.3). Por último, cuando la concentración fue de 1×10^4 conidios/ml, se pudo observar que el 67% de las ninfas de *S. cancellata* lograron sobrevivir al finalizar el ensayo cuando la cepa utilizada fue la LPSc 1227, mientras que este valor se elevó al 90% de sobrevida al cabo del día 9 cuando la cepa analizada fue la LPSc 1226 (Figura 3.4).

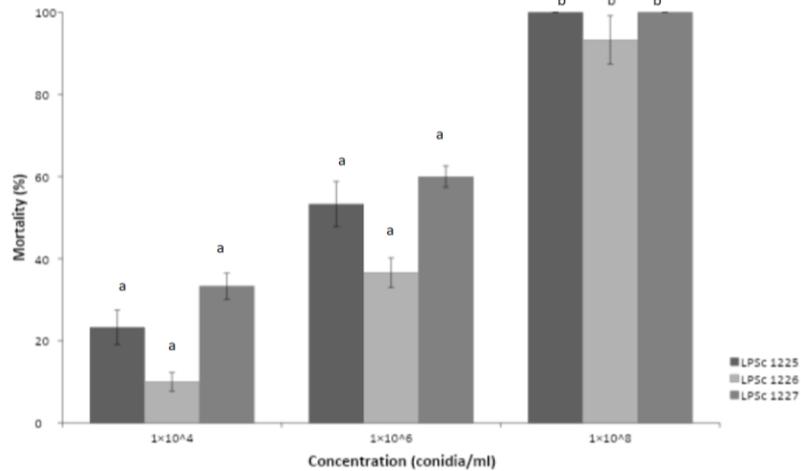


Figura 3.1: Mortalidad acumulada (%) \pm desvío estándar, de ninfas de tercer estadio de *Schistocerca cancellata* dentro de los 10 días posteriores a la inoculación con 1×10^4 ; 1×10^6 y 1×10^8 conidios / ml de *Beauveria bassiana* (LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227). Letras distintas indican diferencias significativas para las diferentes concentraciones (conidios/ml), de acuerdo con Tukey test ($P= 0.05$).

Tabla 3.1: Resultado del análisis de varianza para la mortalidad causada por los distintos aislados de *Beauveria bassiana* LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227, a distintas concentraciones, sobre ninfas de tercer estadio de la langosta *Schistocerca cancellata*.

	GL	F	P
Aislado (LPSc)	2	0,43	0,6500
Concentración	2	7,62	0,0006
Aislado*Concentración	4	0,04	0,9967

Los valores de CL_{50} y los límites de confianza de los diferentes aislados utilizados contra las ninfas de *S. cancellata* se muestran en la Tabla 3.2. La menor CL_{50} ($1,71 \times 10^5$ conidios/ml) fue observada en el aislado LPSc 1227, por lo que se puede concluir que este fue el más virulento para las ninfas de *S. cancellata*, seguido en orden decreciente por los aislados LPSc 1225 y LPSc 1226 respectivamente (Tabla 3.2)

Tabla 3.2: Valores de CL_{50} con límites de confianza del 95% de los aislados de *Beauveria bassiana* sobre ninfas de tercer estadio de la langosta sudamericana *Schistocerca cancellata*.

Aislados de <i>B. bassiana</i>	CL_{50}	Límite de Confianza (95%)
LPSc 1225	$4,53 \times 10^5$	$9,82 \times 10^5 - 2,10 \times 10^6$
LPSc 1226	$1,99 \times 10^6$	$1,99 \times 10^6 - 5,82 \times 10^6$
LPSc 1227	$1,71 \times 10^5$	$2,31 \times 10^4 - 1,27 \times 10^6$

Tabla 3.3: Tabla de comparaciones múltiples, para cada uno de los aislados de *B. bassiana* para la concentración de 1×10^8 conidios/ml, en lo que respecta al TMS de acuerdo al test de Kaplan-Meier.

Comparaciones	Valor observado	Valor-p	p-valor ajustado (Dunn-Sidak)
LPSc 1225*LPSc 1226	29,104	<0,0001	<0,0001
LPSc 1225*LPSc 1227	14,245	0,000	0,001
LPSc 1226*LPSc 1227	30,00	<0,0001	<0,0001

Tabla 3.4: Tabla de comparaciones múltiples, para cada uno de los aislados de *B. bassiana* para la concentración de 1×10^6 conidios/ml, en lo que respecta al TMS de acuerdo al test de Kaplan-Meier.

Comparaciones	Valor observado	Valor-p	p-valor ajustado (Dunn-Sidak)
LPSc 1225*LPSc 1227	29,000	<0,0001	<0,0001

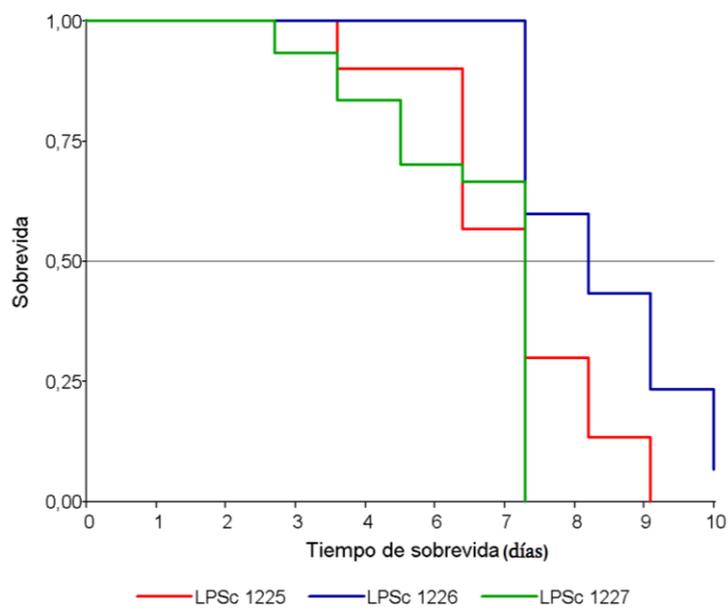


Figura 3.2: Curvas de sobrevivencia sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* cuando sobre las mismas fue aplicada una concentración de 1×10^8 conidios/ml de cada una de las cepas de *B. bassiana* LPSc 1225; LPSc 1226 y LPSc 1227.

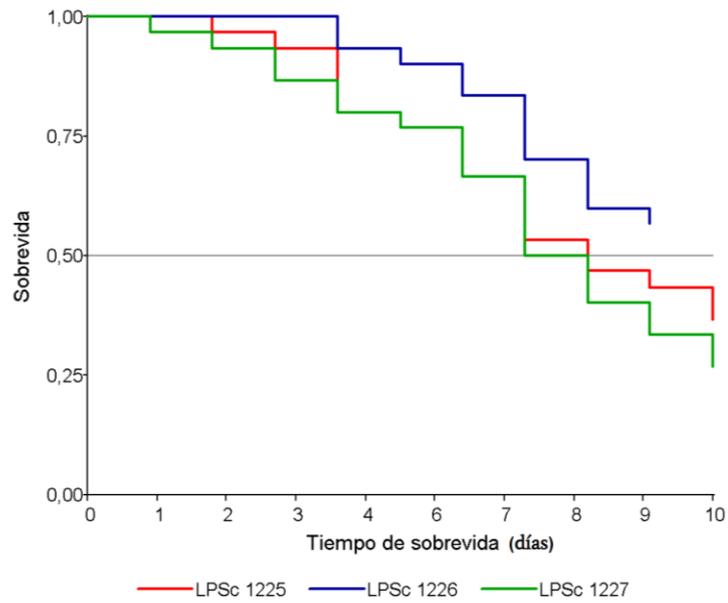


Figura 3.3: Curvas de sobrevivencia sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* cuando sobre las mismas fue aplicada una concentración de 1×10^6 conidios/ml de cada una de las cepas de *B. bassiana* LPSc 1225; LPSc 1226 y LPSc 1227.

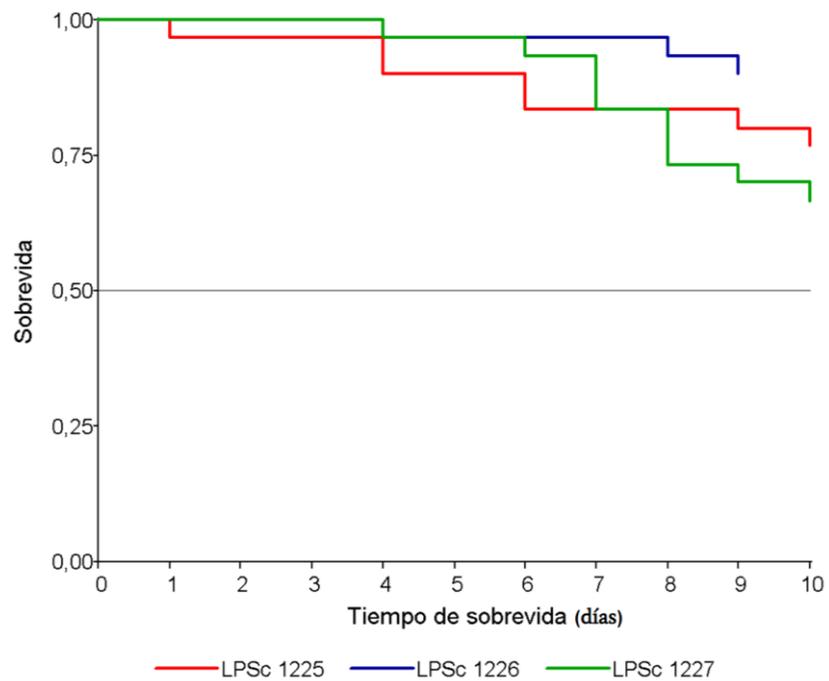


Figura 3.4: Curvas de sobrevivencia sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* cuando sobre las mismas fue aplicada una concentración de 1×10^4 conidios/ml de cada una de las cepas de *B. bassiana* LPSc 1225; LPSc 1226 y LPSc 1227.

3.3 Conclusiones parciales

En los ensayos de laboratorio, si bien no se observaron diferencias significativas en lo que respecta a los porcentajes de mortalidad, se pudo observar que el aislado de *B. bassiana* LPSc 1227 fue el que produjo la mayor mortalidad, los menores valores de TMS y tiempo de sobrevida, como así también los menores valores de CL_{50} sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata*. Estos resultados colocan a este aislado como el más eficiente a la hora de controlar a ninfas de *S. cancellata*.

CAPÍTULO 4

Actividad enzimática (proteolítica, lipolítica y quitinolítica), en condiciones de laboratorio de aislados de *B. bassiana* obtenidos a partir de *Schistocerca cancellata*.

4.1 Introducción

En el proceso de infección de un entomopatógeno, la cutícula del insecto es la primera barrera encontrada. Es por ello que estos microorganismos sintetizan una amplia variedad de enzimas extracelulares involucradas en la degradación de proteínas, quitina y lípidos, los cuales son los principales componentes de la cutícula (Pedrini *et al.*, 2007; Schrank y Vainstein, 2010; Pelizza *et al.*, 2012). Diferentes estudios sugieren que la cantidad y calidad de proteasas y quitinasas sintetizadas por las cepas fúngicas son las que determinarán la virulencia en la relación insecto huésped/patógeno (Fang *et al.*, 2007). Dada la relevancia de la acción enzimática en la penetración y la importancia de la virulencia de las cepas, para un control biológico eficiente resulta importante determinar la relación entre los niveles de estas enzimas (quitinasas, proteasas y lipasas) producidas por los hongos entomopatógenos y su actividad insecticida.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Producción de enzimas a diferentes temperaturas

El nivel de actividad enzimática (quitinolítica, proteolítica y lipolítica) de cada uno de los aislados de *B. bassiana* (LPSc 1225; LPSc 1226 y LPSc 1227) fue estimado en el medio de cultivo APG suplementado con los siguientes sustratos específicos: quitina azure (Sigma, C 3020) a una concentración final de 0,08% según Howard *et al.* (2003), caseína al 0.5% para determinar la actividad proteolítica de acuerdo con Koneman y Roberts (1987) y por último para medir la actividad lipolítica se utilizó, monolaurato de sorbitán (Tween 20) como sustrato lipídico de acuerdo a lo propuesto por Hankin y Anagnostakis (1975). En cada placa de Petri conteniendo el medio y los sustratos se sembró en el centro un disco de agar de 6 mm de diámetro con micelio de cada uno de los aislados. Las actividades enzimáticas fueron evaluadas a tres temperaturas diferentes 4, 15 y 26 °C. Para ello las placas de Petri sembradas fueron incubadas durante 15 días

en cámara de cultivo (Semedic I 291 PF) a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, $15 \pm 1^\circ\text{C}$ y $26 \pm 1^\circ\text{C}$ (Kathiresan y Manivannan, 2006; Saparrat *et al.*, 2008; Sabu *et al.*, 2012; Sudarkodi *et al.*, 2015). Todos los ensayos fueron replicados tres veces a cada temperatura y la actividad enzimática evaluada. Se estimó el crecimiento de cada aislado de *B. bassiana* midiendo el diámetro de cada colonia. La actividad hidrolítica fue estimada cualitativamente según el desarrollo de un halo alrededor de la colonia fúngica formada y se expresó semi-cuantitativamente como la relación entre el halo hidrolítico y el diámetro de la colonia según la técnica descrita por Saparrat *et al.* (2008).

4.2.2 Análisis Estadístico

Se realizó un ANOVA de dos vías para determinar si las diferencias fueron significativas entre los aislados fúngicos con respecto a cada una de las variables estudiadas (actividad quitinolítica, proteolítica y lipolítica a diferentes temperaturas). Para comparaciones posteriores se utilizó una prueba de Tukey ($P= 0.05$). Los análisis de varianza se realizaron con el software InfoStat 2007 (InfoStat 2001).

4.3 Resultados

El aislado *B. bassiana* LPSc 1227 mostró los mayores valores de actividad enzimática, tanto quitinolítica como proteolítica a 4°C con valores de 2.31 ± 0.31 cm y 1.78 ± 0.04 cm, respectivamente (Tabla 4.1). El aislado *B. bassiana* LPSc 1226, mostró los menores valores de actividad quitinolítica y proteolítica a todas las temperaturas evaluadas (Tabla 4.1). Por último, el aislado LPSc 1225, fue el que mostró los mayores valores de actividad lipolítica a cada una de las temperaturas evaluadas (Tabla 4.1). Se observaron diferencias significativas en lo que respecta a la actividad lipolítica para cada una de las dos variables estudiadas y la interacción entre ellas (Tabla 4.2). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en relación con las otras dos actividades enzimáticas (quitinolítica y proteolítica) para cualquiera de las variables y la interacción entre ellas (Tabla 4.2).

Tabla 4.1: Resultados de la actividad lipolítica, proteolítica y quitinolítica de los aislados de *B. bassiana* LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227, a diferentes temperaturas, 4 °C, 15 °C y 26 °C. Los datos se encuentran expresados en media \pm desvío estándar. Letras distintas a la misma temperatura indican diferencias significativas entre cepas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Temperaturas estudiadas	Aislados de <i>Beauveria bassiana</i> (LPSc)		
	1225	1226	1227
Lipolítica			
4°C	4,23 \pm 0,3 a	3,05 \pm 0,2 b	2,78 \pm 0,3 b
15°C	1,18 \pm 0,02 a	1,15 \pm 0,03 a	0 \pm 0 b
26°C	1,18 \pm 0,05 a	1,13 \pm 0,04 a	0 \pm 0 b
Proteolítica			
4°C	1,27 \pm 0,14 a	1,10 \pm 0,08 a	1,78 \pm 0,04 a
15°C	1,11 \pm 0,04 a	1,05 \pm 0,02 a	1,27 \pm 0,15 a
26°C	1,15 \pm 0,1 a	1,04 \pm 0 a	2 \pm 0 b
Quitinolítica			
4°C	0 \pm 0 a	0 \pm 0 a	2,31 \pm 0,31 b
15°C	0 \pm 0 a	0 \pm 0 a	0,5 \pm 0,2 b
26°C	1,30 \pm 1,2 a	0,69 \pm 0,1 b	1,01 \pm 0 b

Tabla 4.2: Análisis de varianza (ANOVA) sobre las actividades lipolítica, proteolítica y quitinolítica de los aislados de *Beauveria bassiana* estudiados, a diferentes temperaturas e interacción entre dichas variables.

	Lipolítica			Proteolítica			Quitinolítica		
	GL	F	P	GL	F	P	GL	F	P
Aislado	2	41,95	<0,0001	2	0,71	0,5060	2	14,71	0,0002
Temperatura	2	278,99	<0,0001	2	1,52	0,2446	2	8,36	0,0027
Aislado*Temperatura		6,71	<0,0017	4	0,81	0,5329	4	7,94	0,0007

4.4 Conclusiones parciales

La cepa de *B. bassiana* LPSc 1227 produjo los mayores niveles de actividad proteolítica para cada una de las temperaturas evaluadas cuando la comparamos con las cepas LPSc 1225 y LPSc 1226. Por otro lado, mostró una buena actividad quitinolítica (mostrando los mayores valores en comparación con las otras dos cepas a 4°C y 15°C). Por lo tanto, y debido a que también fue la cepa más virulenta frente a ninfas de tercer estadio, fue seleccionada como la principal candidata para las pruebas de biocontrol a campo sobre *S. cancellata*.

CAPÍTULO 5

Evaluación preliminar, bajo condiciones de campo, de la actividad de control del aislado *Beauveria bassiana* LPSc 1227 sobre langosta sudamericana *S. cancellata*

5.1 Introducción

En diciembre de 2019 se realizó el ensayo a campo en cercanías de la localidad Campo Durán, Departamento General José de San Martín, provincia de Salta. El sitio fue elegido por la existencia de grandes poblaciones de langostas en estadio ninfal, observándose numerosos grupos de ninfas marchando, denominadas bandas (Fig.5.1). La zona es parte del área acridiógena y con alta presencia de *S. cancellata* durante el resurgimiento de la plaga (2015-2021). Para realizar las pruebas se seleccionó el aislado *B. bassiana* LPSc 1227, ya que fue el que mostró más eficiencia en las pruebas de patogenicidad contra ninfas de tercer estadio de *S. cancellata*, en condiciones de laboratorio, los menores valores de TMS, y produciendo los mayores niveles de actividad proteolítica a las temperaturas evaluadas. Es importante resaltar que éste es el primer estudio de la aplicación de un microorganismo entomopatógeno para el control de *S. cancellata* bajo condiciones de semi-campo en la Argentina.



Figura 5.1: Bandas de *S. cancellata* en 2019. en la localidad Campo Durán, Departamento General José de San Martín, provincia de Salta

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Ensayo preliminar bajo condiciones de semi-campo contra ninfas de la langosta *S. cancellata*

El ensayo se realizó dentro del Establecimiento “La Iluminada” (Latitud -22.20377; Longitud: -63.44121), que se dedica a la producción agrícola. En el momento de la ejecución del ensayo, en la propiedad no había cultivos y la plaga se encontraba en rastrojos y áreas de montes del establecimiento. Se utilizaron jaulas de aluminio con

tejido mosquitero (30 cm x 30 cm), dentro de las cuales fueron alojadas 20 ninfas de tercer estadio de *S. cancellata*, las cuales fueron alimentadas durante el tiempo que duró el ensayo con hojas de arbustos de la zona (Fig. 5.2). Las pruebas se realizaron sobre ninfas con el objetivo de lograr un control temprano simulando una situación real de manejo preventivo de esta plaga. Esto se debe a que la etapa juvenil es el momento óptimo de control ya que, los insectos no tienen capacidad de vuelo y los tratamientos pueden hacerse de manera localizada (Senasa, 2018). Asimismo, se utilizaron ninfas de tercer estadio buscando obtener un mayor éxito de penetración del hongo debido al estado de desarrollo de la cutícula del insecto (Pelizza *et al.*, 2012, 2018, 2021). El bioinsecticida se formuló como polvo mojable con base en conidios de la cepa LPSc 1227 de *B. bassiana* a una concentración de 8 gr del producto por hectárea. El formulado fue desarrollado en colaboración con la empresa de insumos agrícolas NITRAP SRL, mediante la firma de un convenio (Resolución CONICET -2018-2531) cuya finalidad es el desarrollo de un formulado biológico en base a hongos entomopatógenos para el control de tucuras y langostas. La concentración final del formulado fue de 1×10^8 conidios/g de producto. Los ninfas que se encontraban en el interior de las jaulas fueron pulverizadas a modo de spray con una motomochila marca Stihl[®], con una suspensión del formulado biológico en 9.5 litros de agua y 500 cc de aceite de soja, volumen con el cual se cubre una superficie aproximada de 0,25 hectáreas (Figura 5.3). Se realizaron tres réplicas de 20 ninfas cada una tratadas con el formulado biológico y un control tratado de igual modo, pero sin el agregado del inóculo fúngico, es decir, fueron rociadas solo con aceite de soja que fue el líquido con el cual se mezcló el producto (polvo mojable). Las jaulas con los insectos en su interior, tanto tratados como controles, fueron colocadas sobre un terreno plano a la intemperie en una zona en la cual se encontraba una gran cantidad de ninfas de *S. cancellata*. La separación entre jaulas fue de 1 metro, salvo las jaulas control que fueron colocadas posteriormente a la aplicación del bioinsecticida a 3 metros de distancia de las jaulas tratadas. Los registros de mortalidad se realizaron cada 24 horas hasta los 14 días posteriores a la inoculación. Los insectos muertos fueron retirados y esterilizados superficialmente primero en alcohol 70° (5 segundos) y luego con hipoclorito de NaClO al 0.5% (1 min), posteriormente se realizaron dos baños sucesivos en agua destilada estéril. Los insectos así tratados fueron colocados en cámaras húmedas a fin de favorecer la manifestación del microorganismo (Lacey y Brooks, 1997). La confirmación de la mortalidad debido a la acción fúngica fue realizada mediante la

visualización de la manifestación externa del hongo entomopatógeno y confirmación mediante observación microscópica por contraste de fases del micelio.



Figura 5.2: a) Instrumental utilizado para la colecta de ninfas y armado de jaulas. b) Jaulas de aluminio y c) Ninfas de *S. cancellata* de tercer estadio.



Figura 5.3: Aplicación con motomochila sobre jaulas con ninfas de langosta sudamericana.

5.3 Resultados

En lo que respecta a la mortalidad ocasionada sobre los insectos tratados con el formulado biológico en base al aislado de *B. bassiana* LPSc 1227, se observaron en todas las réplicas mortalidades superiores al 50%. La mortalidad en los insectos tratados fue del 56,2% para la jaula 1, del 68,7% para la jaula 2 y del 62,5% para la jaula 3 (Figura 5.4). La mortalidad obtenida en los insectos tratados fue corregida utilizando la fórmula de Abbott (1925), debido a que se observó una mortalidad del 20% en los insectos control. Se registraron mediante la utilización de un termohigrógrafo datos de temperatura y humedad relativa ambiente durante la aplicación del producto, las cuales fueron de 27°C y 46% respectivamente.

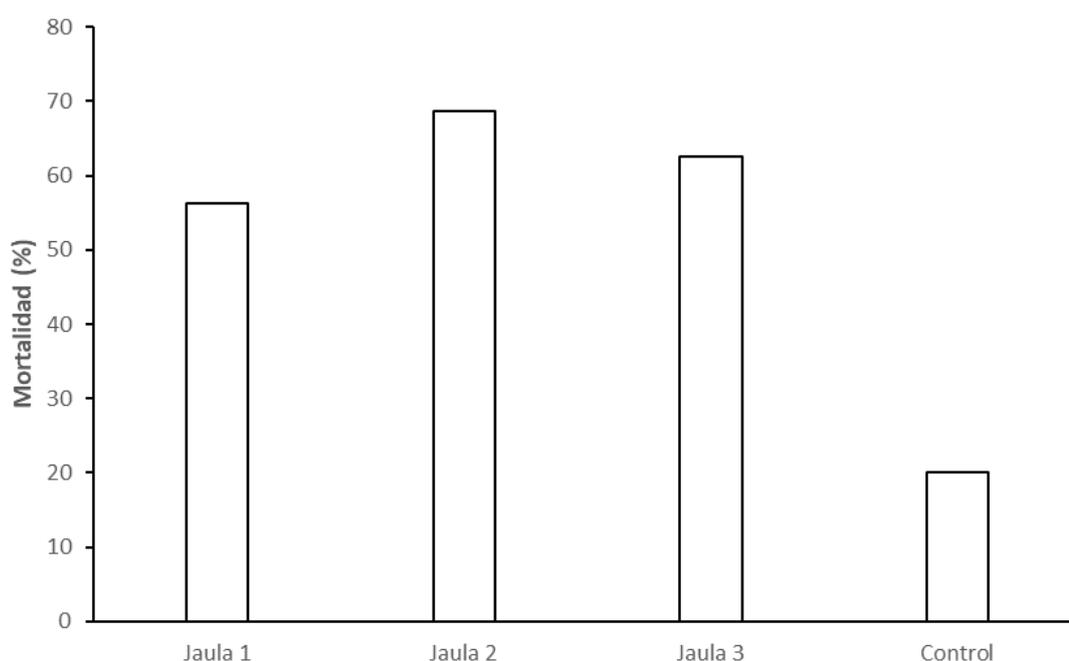


Figura 5.4: Porcentaje de mortalidad producido por el formulado fúngico sobre ninfas de tercer estadio de la langosta sudamericana *Schistocerca cancellata*, al cabo de 14 días.

5.4 Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos en la primera prueba realizada en condiciones de semi-campo con el formulado biológico del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, han sido muy positivos debido a la obtención de una mortalidad promedio en los insectos tratados del 62,4%. Los ensayos deben repetirse en nuevas aéreas y con distintas formulaciones que mejoren la performance del entomopatógeno. Es importante mencionar que este trabajo

se está realizando en colaboración con la empresa NITRAP SRL, interesada en el desarrollo de un formulado biológico a base de *B. bassiana* LPSc 1227.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES

6.1 Discusión

Algunas de las ventajas que ofrecen los hongos entomopatógenos para su uso en programas de control microbiano de insectos plaga son: su alta especificidad, transmisión por contacto, dispersión natural, seguridad para organismos no blanco y la capacidad de mantener un control duradero una vez establecidos en el ambiente (Van Driesche *et al.*, 2007).

Este es el primer trabajo donde se lograron aislar tres aislados nativos del hongo entomopatógeno de *B. bassiana* a partir de la langosta sudamericana *S. cancellata*, los cuales fueron depositados en el cepario del Instituto Spegazzini con los siguientes códigos identificatorios: LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227. Si bien, se han registrado infecciones ocasionadas por *B. bassiana* en distintas especies de tucuras y langostas en diferentes regiones del mundo (Goettel, 1992) e incluso en nuestro país (Pelizza *et al.*, 2010), hasta el presente, no existían registros de ninguna especie de hongo entomopatógeno afectando a *S. cancellata*. Por otro lado, es importante tener en cuenta, que estos tres aislados de *B. bassiana* fueron hallados en los alrededores de la localidad de Taboada en la provincia de Santiago del Estero, donde las temperaturas son elevadas y la humedad relativa ambiente es baja, condiciones desfavorables para el desarrollo fúngico (Jaronski, 2010). Por lo tanto, el aislado de *B. bassiana* LPSc 1227, que resultó ser el más efectivo en los ensayos del presente trabajo, parece estar adaptado a las condiciones estresantes que constituyen una limitante en el uso de entomopatógenos en el control biológico de langostas (Pelizza *et al.*, 2012).

La patogenicidad de los hongos entomopatógenos se rige por muchas condiciones diferentes relacionadas con el huésped involucrado, el patógeno mismo y el ambiente. La penetración del hongo a través de la cutícula del insecto está mediada por la combinación de procesos mecánicos y enzimáticos (St. Leger *et al.*, 1986a,b; Vega *et al.*, 2012). Los hongos entomopatógenos como *B. bassiana* penetran la cutícula del insecto, con la ayuda de diversas enzimas extracelulares que degradan dicha cutícula. Las principales enzimas que intervienen en este proceso son las proteasas, quitinasas y lipasas (Binod *et al.*, 2007). En las distintas especies de hongos entomopatógenos estas

hidrolasas juegan un factor clave en la virulencia, debido a que los sustratos que degradan son los componentes estructurales de la cutícula del insecto (Pedrini *et al.*, 2007). Se han investigado las propiedades catalíticas y reguladoras de estas enzimas, así como su potencial para el posible desarrollo como bioplaguicidas y agentes de control biológico microbiano para varias plagas de insectos (Kramer *et al.* 1997). Entre las enzimas producidas por las distintas especies de hongos entomopatógenos, las enzimas quitinolíticas juegan un papel clave en la despolimerización del exoesqueleto del insecto durante el ataque de hongos entomopatógenos (Sahai y Manocha, 1993).

En condiciones de laboratorio, se observaron diferencias en la mortalidad de ninfas de tercer estadio de *S. cancellata* producida por los tres aislados nativos de *B. bassiana* obtenidos en el presente trabajo. Esto podría relacionarse con la capacidad de los diferentes aislados para superar la respuesta inmune de los insectos y a mecanismos moleculares y fisiológicos como la excreción de enzimas extracelulares (Valero-Jimenez *et al.*, 2014). En este estudio el aislado de *B. bassiana* LPSc 1227 fue el que produjo la mayor mortalidad a cada una de las concentraciones estudiadas con porcentajes de mortalidad de 100, 60 y 33,3% a concentraciones de 1×10^8 , 1×10^6 y 1×10^4 conidios/ml, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Prior *et al.* (1995), quienes informaron porcentajes de mortalidad similares luego de aplicar las mismas concentraciones fúngicas sobre la langosta plaga *S. gregaria*. Por otro lado, esta cepa mostró los menores valores de TMS a cada una de las dosis evaluadas, este es otro parámetro que se tuvo en cuenta a la hora de seleccionarla para realizar con ella los ensayos a semi-campo. Esta mayor virulencia expresada por el aislado LPSc 1227 de *B. bassiana* podría estar determinada por los mayores niveles de actividad proteolítica para cada una de las temperaturas evaluadas, mientras que, además mostró los mayores niveles de actividad quitinolítica a temperaturas de 4°C y 15°C. En este sentido es oportuno mencionar, que la quitinasa es la enzima más importante a tener en cuenta con respecto a la virulencia de una cepa fúngica entomopatógena debido a que es la responsable de degradar el polímero de quitina, principal componente de la cutícula del insecto (Dhawan y Joshi, 2017). Los resultados obtenidos concuerdan con los de Khosravi *et al.* (2015) y Dhawan y Joshi (2017). Según estos autores, los aislados fúngicos que producían los valores más altos de actividad quitinolítica y proteolítica, también causaban una mayor mortalidad en la mosca de sierra rosa *Arge rosae* y la oruga *Pieris brassicae*, respectivamente. En lo que respecta al ensayo realizado bajo condiciones de semi-campo, con el aislado LPSc 1227

de *B. bassiana*, se obtuvo una mortalidad promedio de 62,4% sobre ninfas de tercer estadio de *S. cancellata*. Si bien los resultados obtenidos bajo condiciones de semi-campo son alentadores, se necesitará realizar una mayor cantidad de este tipo de ensayos, bajo distintas condiciones climáticas y regiones geográficas, donde normalmente se encuentran los ejemplares de *S. cancellata* para poder confirmar el efecto controlador del aislado *B. bassiana* LPSc 1227.

6.2 Conclusiones

S. cancellata es una plaga con un gran potencial de daño cuyo resurgimiento, desde el año 2015, amenaza a varios países de Sudamérica. Para lograr un manejo efectivo de la plaga se requieren distintas herramientas de control, en donde el biocontrol es una estrategia fundamental que hoy no es una alternativa disponible para ser utilizada. En este trabajo se encontraron y apartaron por primera vez en Argentina, tres aislados de *B. bassiana* a partir de la langosta sudamericana *S. cancellata*. Los aislados fueron depositados en el cepario del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini (FCNyM-UNLP) con los siguientes códigos identificatorios; LPSc 1225, LPSc 1226 y LPSc 1227. Los resultados obtenidos demostraron el potencial del aislado de *B. bassiana* LPSc 1227, como agente de control biológico de *S. cancellata*. A través de la investigación realizada, se concluye que este aislado podría ser una pieza clave en el manejo preventivo y una alternativa al control químico de *S. cancellata*. Para ello es necesario continuar con nuevos estudios que permitan validar dicho ACB, logrando su registro oficial y disponibilidad para su uso a nivel comercial.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology.* 215: 403-410.
- Astacio, O. 1987. Manual del prospector antiacridiano. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). División de Sanidad Vegetal. Boletín técnico 22. Costa Rica. Pp: 1-49.
- Barrera, M. y Turk, S. 1983. Estado actual de la langosta *Schistocerca cancellata paranensis* en la Argentina. Nuevos aportes a su bioecología. *Act. Zool. Lill.* 37: 15-29.
- Barrientos Lozano, L. 1992. Manual Técnico sobre la langosta voladora (*Schistocercapiceifrons piceifrons* Walker, 1870) y otros Acridoideos de Centro América y Sureste de México. FAO-AGOL/OIRSA. San Salvador, El Salvador. 162p.
- Barrientos Lozano, L. 2011. Dinámica Poblacional, Biología y Ecología de la Langosta Suramericana (*Schistocerca cancellata*, Serville). Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. 135 p.
- Belovsky, G. E. 2000. Do grasshoppers diminish grassland productivity? A new perspective for control based on conservation. In *Grasshoppers and Grassland Health: Managing Grasshopper Outbreaks without Risking Environmental Disaster*, ed. JA Lockwood, AV Latchininsky, MG Sergeev, pp. 7–30. Dordrecht, Neth.: Kluwer Acad. Publ.
- Binod, P.; Sukumaran, R.K.; Shirke, S.V.; Rajput, J.C.; Pandey, A. 2007. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1845–1852.

Bustillo, A., 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. In: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá, pp. 30–53.

Butt, T.M. and Goettel, M.S. (2000) Bioassays of Entomogenous Fungi. In: Navon, A. and Ascher, K.R.S., Eds., Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes, CAB International, Wallingford, UK, pp. 141-195.

Cabrera, A.L., Willink. A. 1973. Biogeografía de América Latina. Monogr. 13, Ser. Biol. Washington, DC: OEA.

Canel, R.S., Wagner, J.R., Stenglein, S.A., Ludemann, V. 2013. Indigenous filamentous fungi on the surface of Argentine an dry fermented sausages produced in Colonia Caroya (Córdoba, Argentina). *Int. J. Food. Microbiol.*164: 81-86.

Carbonell, C.; Cigliano, M.M.; Lange, C.E. 2006. Acridomorph (Orthoptera) species of Argentina and Uruguay. CD-ROM. Publications on Orthopteran Diversity, The Orthopterists Society at the "Museo de La Plata", Argentina.

Charnley, A.K., 1992 Mechanism of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer, C.J., C. Prior (eds.), Biological control of locusts and grasshoppers. Melkshan, UK: CAB International. pp. 191–190.

Cigliano M.M; Pocco M.E; Lange C.E. 2014. Eriococcidae. En Roig-Juñent, S.; L.E. Claps. Morrone J.J. (Directores). 2014. Biodiversidad de Artrópodos Argentinos volumen 3. Pags. 11-36. Editorial INSUE - UNT, San Miguel de Tucumán, Argentina.

COPR (Centre for Overseas Pest Research). 1982. The locust and grasshopper agricultural manual, COPR, London. 690 p.

Cullen, D.A.; Cease, A.; Latchininsky, A.V.; Ayali, A.; Berry, K.; Buhl, J.; De Keyser, R.; Foquet, B.; Hadrich, J.C.; Matheson, T.; Ott, S.R.; Poot-Pech, M.A.; Robinson, B.E.; Smith, J.; Song, H.; Sword, G.A.; Vanden Broeck, J.; Verdonck, R.; Verlinden,

H.; Rogers, S.M. 2017. From molecules to management: Mechanisms and consequences of locust phase polyphenism. *Adv Insect Phys* 53: 167-285.

De Wysiecki, M.L., Lange, C.E. 2005. The locust *Schistocerca cancellata* Serville (Orthoptera: Acrididae: Cyrtacanthacridinae) in Argentina: biology, ecology, history and control. In: Memories of the second international course: Integrated management of the Central American locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons*, Walker) and acridoideos pest in Latin América. pp. 151-156.

Dhawan, M.; Joshi, N.; 2017. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae*. *Braz. J. Microbiol.* 48, Pp. 522–529.

Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, Y.C. InfoStat Versión 2011. Grupo InfoStat, FCA; Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, Argentina, 2011; pp. 195–199. Available online: <http://www.infostat.com.ar>

Duperchy, E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 111 p.

Eilenberg, J.; Hajek, A.E.; Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387-400.

Fang, W.G.; Gou, S.J.; Pei, X.Q.; Zhang, Y.J.; Xiao, Y.H.; Li, D.M.; Jin, K.; Bidochka, M.J.; Pei, Y. 2007. Increased Insect Virulence in *Beauveria bassiana* Strains Overexpressing and Engineered Chitinase, *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 295–302

FAO. 2013. La resiliencia de los medios de vida – Programa marco de reducción del riesgo de desastres para la seguridad alimentaria y nutricional. <http://www.fao.org/3/a-i3270s.pdf>

Farrow R.A. 1979. Population dynamics of the Australian Plague Locust, *Chortoicetes terminifera* (Walker), in Central Western New South Wales I. Reproduction and migration in relation to weather. *Aust. J. Zool.* 27: 717–45.

Freimoser, F.M., A. Grundschober, U. Tuor, M. Aebi, 2003. Regulation of hyphal growth and sporulation of the insect pathogenic fungus *Entomophthora thripidum* in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* 222: 281–287.

García, L.C.; Raetano, C.G.; Leite, L.G. 2008. Application technology for the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *Steinernema sp* (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. *Neotrop. Entomol.* 37: 305–311.

García García, M. A., Capello García, S., Lesher Gordillo, J. M., Molina Martínez, R.F. 2008. Hongos entomopatógenos como una alternativa en el control biológico. *Kuxulkab* 27(15): 25-28.

Gastón, J. 1969. Síntesis histórica de las invasiones de langosta en la Argentina. Secretaría Estado Agricultura y Ganadería. Publicación Miscelánea 433: 1-30.

Gay P.E., Lecoq M., Piou C. 2015. Cyclic locust invasions explained through a multi-agent model. Conference: 12th International Congress of Orthopterology At: Ilhéus, Brasil Volume: Metaleptea, Abstract Book, p. 104.

Gay, P. E., Lecoq, M. and Piou, C. 2019. The limitations of locust preventive management faced with spatial uncertainty: exploration with a multi-agent model. *Pest Manag Sci.* 76: 1094-1102. [doi:10.1002/ps.5621](https://doi.org/10.1002/ps.5621)

Glare, T. 2004. Biotechnological potencial entomopathogenic Fungi. In: *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Enviromental Applications*. Pp.79-90.

González, M., Miglioranza, K.S., Aizpún, J.E., Isla, F.L., & Peña, A. 2010. Assessing pesticide leaching and desorption in soils with different agricultural activities from Argentina (Pampa and Patagonia). *Chemosphere* 81: 351-358.

González Castillo, M., Aguilar, C.N., Rodríguez Herrera, R. 2012. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 4 (8): 42-55.

Goettel, M.S., 1992. Fungal agents for biocontrol. In: Lomer, C.J., Prior, C. (Eds.), *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. CABI, Wallingford, pp. 122–132.

Goettel, M.S., Inglis, G.D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Lacey, L.A. (Ed.), Academic Press, London. pp. 213–249.

Hankin, L., Anagnostakis, S.L., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.

Harvey, A. W. 1981. Nota sobre la langosta *Schistocerca* del Perú. *Revista Peruana de Entomología* 24 (1): 141-142.

Henry, J. E. 1985. *Melanoplus* spp. En: *Handbook of Insect Rearing*. Singh, P. y R. F. Moore (Eds.). Vol. I, pp. 451-464.

Howard, M.B., Ekborg, N.A., Weiner, R.M., Hutcheson, S.W., 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 627-635.

Humber, R. A. 1997. Fungi: Identification. En: *Manual of techniques in Insect Pathology*. Lacey, L. (ed). San Diego, California: Academic Press, pp 255–282.

Humber, R.A. 2012a. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification of entomophthoroid fungi. *Mycotaxon* 120: 477-492.

Humber, R.A. 2012b. Identification of entomopathogenic fungi. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Lacey, L.A. (Ed.), The Netherlands: Academic Press. Amsterdam, pp. 151–187.

Hunter, D. 2005 Mycopesticides as part of integrated pest management of locusts and grasshoppers. J. Orthoptera Res. 14: 197-201.

Hunter, D. M. y Cosenzo E. L. 1990. The origin of plagues and recent outbreaks of the South American locust *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae) in Argentina. Bull. Entomol. Res. 80: 295-300.

Hunter, D., Milner, R; Scanlan, J. 2000. Use of the fungus *Metarhizium anisopliae* to control locusts in Australia. XXI International Congress of Entomology. Foz de Iguacu, Brazil. Abstracts Book 1, pp. 257.

IICA Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura , 2020. Análisis beneficio - costo del Programa Nacional de Langostas y Tucuras (SENASA) / Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura y Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. – Argentina. 56 p.

Jaronski, S.T. (2010), 'Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens', *BioControl* 55: 159-185.

Kathiresan, K., Manivannan, S., 2006. Cellulase production by *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove rhizosphere soil. *Res. J. Microbiol.* 1 (5): 438– 444.

Kirk, P.; Cannon, P.; Minter, D., Stalpers, J. (2011). *Dictionary of the Fungi* 10th, Edition

Khosravi, R., Sendi, J.J., Zibae, A., Shokrgozar, M.A., 2015. Virulence of four *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Asc., Hypocreales) isolates on rose sawfly, *Arge rosae* under laboratory condition. *Journal of King Saud University Univ. Sci.* 27: 49–53.

Köhler, P. 1962. Ecología de la zona central y de gregarización de la langosta en la República Argentina. *Idia Supplement* 7. pp. 108.

Köhler, P. 1982. Relación entre biosfera y ecosistema de la langosta migratoria. *Fundación Miguel Lillo, Miscelánea.* 66: 5-38.

Koneman, E., Roberts, G., 1987. Practice laboratory Mycology. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires-Argentina. 221 p.

Kramer K.J., Muthukrishnan S., Johnson L., White F. 1997. Chitinases for insect control. In: Carozzi N, Koziel M (eds) Advances in insect control. The role of transgenic plants, Taylor and Francis Publishers, Washington DC, pp 185-193.

Lacey, L.A. y Brooks, W.M. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insects. En: "Manual of techniques in Insect Pathology" (L.A. Lacey, ed.) Academic, San Diego, pp. 1-15.

Lahr, J., Gadji, B., Diu, D. 2000. Predicted buffer zones to protect temporary pond invertebrates from ground-based insecticide applications against desert locusts. Crop Prot. 19 (7): 489-500.

Lange, C.E., Sanchez, N.E., Wittenstein, E. 2000. Effects of the pathogen *Nosema locustae* (Protozoa: Microspora) on mortality and development of nymphs of the South American locust, *Schistocerca cancellata* (Acrididae). J. Orthoptera Res. 9: 77-80.

Lange, C.E., Wittenstein, E. 1998. Susceptibilidad de la langosta *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae) a diferentes entomopatógenos. Rev. Soc. Entomol. Argent. 57: 19-22.

Lange, C.E., Wittenstein, E., Sanchez, N.E. 1998. Susceptibilidad de la langosta *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae) a *Nosema locustae* (Protozoa: Microspora) en laboratorio. Revista Fac. Agron. Univ. Nac. La Plata (UNLP) 103: 185-189.

Lane B.S., Humphreys B.S.A.M., Thompson K., Trinci A.P.J. 1988 ATP content of stored spores of *Paecilomyces farinosus* and the use of ATP as criterion of spore viability. Trans. Brit. Mycol. Soc. 90:109-111.

Larson, D. P., O'Neil, K. M., Kemp, W. P. 1999. Evaluation of the accuracy of sweep sampling in determining grasshopper (O: A) community composition. J. Agric. Urban Entomol. 16 (3): 207.

Latchininsky A.V. 2008. Grasshopper outbreak challenges conservation status of a small Hawaiian Island. J. Insect Conserv. 12 (3–4): 343–57.

Latchininsky A.V., Sword G., Sergeev M, Cigliano M.M., Lecoq M. 2011. Locusts and grasshoppers: behavior, ecology, and biogeography. Psyche 2011: 578327.

Lecuona, R. 1995. Microorganismos Patógenos Empleados para el Control Microbiano de Insectos Plaga. Ed. Roberto Lecuona. pp. 337.

Liebermann, J. 1972. The current state of the locust and grasshopper problem in Argentina. Proc. Int. St. Conf. Current Future Probl. Acridol., London, pp. 191-198.

Lord, J.C. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. J. Invertebr. Pathol., 89 (1): 19–29.

Luna-Rodriguez, J.A., Lecuona, R. 2005. Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la tucura *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). Rev. Invest. Agropec. 31: 67-84.

McGuire, M.R., Galan-Wong, L.J., Tamez-Guerra, P. 1997. Bacteria: Bioassay of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran larvae. In Manual of Techniques in Insect Pathology. Pp 91-99.

Madelin, M. F. 1963. Diseases caused by Hyphomycetous fungi. En: Insect pathology an advanced treatise. Steinhaus, E. A. (Ed.). New York and London. Vol. 2, 687 p.

Magalhaes B., de Faria, M., Lecoq, M., Schmidt, F., Silva, J., Frazao, H., Balanca, G., Foucard, A. 2001. The use of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridium* against the grasshoppers *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. J. Orthoptera Res. 10: 199-202.

- Magor, J.I., Lecoq, M., Hunter, D.M. 2008. Preventive control and Desert Locust plagues. *Crop Protection* 27 (12): 1527–1533.
- Mascarin, G.M., Jaronski, S.T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32(11) 177
- Martin, P. A., Johnson, D. L., Forsyth, D. L., Douglas, J., Hill, B. D. 2000. Effects of two grasshopper control insecticides on food resources and reproductive success of two species of grassland songbirds. *Env. Tox. & Ch.* 19 (12): 2987.
- Milner R., Hunter, D. 2001. Recent developments in the use of fungi as biopesticides against locusts and grasshoppers in Australia. *J. Orthoptera Res.* 10: 271-276.
- Medina, H. E. 2014. Pautas para la implementación del control biológico en langosta en el marco del Programa Nacional de Acridios del Senasa. Tesis de grado correspondiente al ciclo de intensificación para acceder al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. 63p.
- Medina, H. E. 2016. Langosta. Explosión demográfica de la plaga que nunca se fue. XII Encuentro de Monitoreo y Manejo de Plagas, Enfermedades y Malezas, Ciudad de Córdoba, Junio 2016. Expuesto en forma oral, publicado en resumen de la jornada.
- Medina, H.E., Cease, A., Trumper, E., 2017. The resurgence of the South American locust (*Schistocerca cancellata*). *Metaleptea* 37 (3): 17–21.
- Medina, H.E., Trumper, E. 2018. La langosta sudamericana (*Schistocerca cancellata* Serville, 1838). Hipótesis sobre su regreso y estrategias de manejo. Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Tucumán. Octubre de 2018. Libro de resúmenes
- Monzón, A., 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integral de Plagas.* (CATIE, Costa Rica) 63: 95–103.
- Papierok, B.; Hajek, A.E. 1997. *Manual of techniques in insect pathology.* Academic Press. San Diego, California.

Pariona Mendoza, N. 2006. Evaluación de la capacidad entomocida de *Beauveria* sp. sobre *Schistocerca piceifrons* peruviana (Lynch Arribalzaga, 1903) nativos del departamento de Ayacucho. Tesis para optar al Título profesional de Biólogo con mención en microbiología y parasitología. Lima, Perú. 90p.

Pedrini, N., Crespo, R., Juarez, M.P., 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Com. Biochem. Physiol.* 146: 124–137.

Pelizza, S.A., Cabello, M.N., Lange, C.E. 2010. Nuevos registros de hongos entomopatógenos en acridios (Orthoptera: Acridoidea) de la República Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69 (3-4): 287-291.

Pelizza, S.A., Eliades, L.A., Scorsetti, A.C., Cabello, M.N., & Lange, C.E. 2012. Entomopathogenic fungi from Argentina for the control of *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae) nymphs: fungal pathogenicity and enzyme activity. *Biocontrol Sci. Technol.* 22 (10):1119–1129.

Pelizza, S.A., Scorsetti, A.C., Fogel, M.N., Pacheco Marino, S.G., Cabello, M.N., Lange, C.E. 2015a. “Compatibility between entomopathogenic fungi and biorational insecticides against *Ronderosia bergi* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae)”. *Biocontrol* 60 (1): 81-91.

Pelizza, S.A., Scorsetti, A.C., Russo, M.L., Sy, V., Pacheco-Marino, S.G., Lange, C.E. 2015b. “Use of entomopathogenic fungi combined with biorational insecticides to control *Dichroplus maculipennis* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae) under semi-field conditions.” *Biocontrol Sci. Technol.* 25 (11): 1241-1253.

Pelizza, S.A., Medina, H., Ferreri, N.A., Eliades, L.A., Pocco, M.E., Stenglein, S.A., Lange, C.E. 2018. Virulence and enzymatic activity of three new isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) from the South American locust *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae). *Elsevier Science; J. King Saud Univ. - Science*; 32(1): 44 -47 <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.11.006>.

Pelizza, S.A., Ferreri, N.A., Eliades, L.A., Galarza, B., Cabello, M. N., Russo, M.L., Vianna, M.F., Scorsetti, A.C., Lange, C.E. 2021. “Enzymatic activity and virulence of

Cordyceps locustiphila (Hypocreales: Cordycipitaceae) on the South American locust *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae)” J. King Saud Univ. Sci. 33: 101-411.

Pocco M.E., Cigliano M.M, Foquet B., Lange C.E., Nieves E.L., Song H, 2019. Density-Dependent Phenotypic Plasticity in the South American Locust, *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae), Anna. Entomol. Soc. Am., Volume 112: 458-472 <https://doi.org/10.1093/aesa/saz032>

Prior, C., Carey, M., Abraham, Y.J., Moore, D., and Bateman, R.P. 1995. ‘Development of a bioassay method for the selection of entomopathogenic fungi virulent to the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.)’, J. App. Ent., 119: 567-573.

Pucheta Díaz, M., Flores Macias, A., Rodríguez Navarro, S., De la Torre, M. 2006. Mecanismos de acción de los Hongos Entomopatógenos. Interciencia 31(12): 856-860.

Rehner S.A., Minnis A.M., Sung G.H., Luangsaard J.J., Devotto L., Humber R.A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*, Mycologia, 103:5, 1055-1073, DOI: [10.3852/10-302](https://doi.org/10.3852/10-302)

Roy, H.E., Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E., Pell, J.K. 2006. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. Ann. Rev. Entomol.. 51: 331-357.

Sabu, A., Sarita, S., Pandey, A., Bogar, B., Szakacs, G., Socol, C.R., 2012. Solid-State Fermentation for Production of Phytase by *Rhizopus oligosporus*. Appl. Biochem. Biotechnol. 103: 251–260.

Sahai A.S., Manocha M.S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. FEMS Microbiol Rev 11:317-338.

Samson, R.A., Evans, H.C.; Latgé, J.P. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Ed. Springer-Verlag.

Samways M.J. 2000. Can locust control be compatible with conserving biodiversity? In Grasshoppers and Grassland Health. Managing Grasshopper Outbreaks without Risking Environmental Disaster, ed. JA Lockwood, AV Latchininsky, MG Sergeev, pp. 173–80. Dordrecht, Neth.: Kluwer Acad. Publ.

Samways M.J.; Lockwood J.A. 1998. Orthoptera conservation: pests and paradoxes. J. Insect Conserv. 2:143–49

Sánchez, N. E., Wittenstein, E., de Wysiecki, M. L., Lange C. 1997. Life history parameters of the gregarious phase of the South American locust, *Schistocerca cancellata* (Serville) (Orthoptera: Acrididae), under laboratory conditions. J. Orthoptera. Res., 6: 121-124.

Saparrat, M.C.N., Rocca, M., Aulicino, M.B., Arambarri, A., Balatti, P., 2008. *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* leaf litter decomposition by selected fungi in relation to their physical and chemical properties and the lignocellulolytic enzyme activity. Eur. J. Soil Biol. 44: 400-407.

Schrank, A., Vainstein, M.H. 2010. ‘*Metarhizium anisopliae* Enzymes and Toxins’, Toxicon, 56: 1267-1274.

Senasa. 2018. Manual de procedimientos generales para el control de la langosta sudamericana. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/manual_langosta1_0.pdf

Simpson, S. J., Sword, G.A. 2009. Phase polyphenism in locusts: mechanisms, population consequences, adaptive significance and evolution, pp. 140–190. In D. W. Whitman and T. N. Ananthakrishnan (eds.), Phenotypic plasticity of insects mechanisms and consequences. Sci. Publishers, Enfield, NH.

Shah, P. A., Kooyman, C. Paraiso, A. 1997. Surveys for fungal pathogens of locust and grasshoppers in Africa and near east. En: Microbial control of grasshoppers and locust. Goettel, M. & Johnson, D. (Eds.). Mem. Entom. Soc. Can. 171: 27-35.

- Shapiro Ilan, D.I., Mizell, R.F., Cottrell, T.E., Horton, D.L. 2008. Control of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* with entomopathogenic nematodes: effects of application timing, alternate host plant, and nematode strain. *Biol. Control*. 44: 207–215.
- Smith D., Lockwood J.A., Latchininsky A.V., Legg D.E. 2006. Changes in non-target arthropods populations following application of liquid bait formulations of insecticides for control of rangeland grasshoppers. *Int. J. Pest Manag.* 52: 125–39
- Stenglein, S., Balatti, P., 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiol. Mol. Plant Path.* 68: 158-67.
- Stenglein, S.A., Rodriguero, M.S., Chandler, E., Jennings, P., Salerno, G.L., Nicholson, P. 2010. Phylogenetic relationships of *Fusarium poae* based on EF-1 α and mtSSU sequences. *Fungal Bio.* 114: 96-106.
- St. Leger R.J, Cooper R.M, Charnley A.K. 1986a Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degrading in vitro by enzymes from entomopathogens. *J Invertebr Pathol* 47: 167-177.
- St. Leger R.J, Charnley A.K, Cooper M. 1986b Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J Invertebr Pathol* 47: 295-302.
- St. Leger, R.J., Wang, C., Fang, W. 2011. New perspectives on insect pathogens. *Fungal Biology Rev.* 25: 84-88.
- Story, P., Cox, M. 2001. Review of the effects of organophosphorus and carbamate insecticide on vertebrates. Are there implications for locust management in Australia. *Wildlife Research.* 28: 179-193.
- Sosa-Gómez, D.R., López Lastra, C.C., Humber, R.A. 2010. An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brazil. *Mycopathologia.* 170: 61–76.

Spegazzini, C. 1880. *Sporotrichum globuliferum*. Fungi Argentini N° 164. Anales de la Sociedad Científica Argentina. 10: 278- 282.

Spegazzini, C. 1913. *Mycetes argentinenses*. Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Buenos Aires. 20: 167-186.

Sudarkodi, C., Sundar, S.P.K., Murugan, M., 2015. Production and Optimization of Protease by Filamentous Fungus isolated from Paddy Soil in Thiruvavur District Tamilnadu. J. A. B. B. 3 (06): 066–069.

Symmons, P. M., & Cressman, K. (2001). Desert Locust Guidelines: Biology and Behaviour. Rome: FAO.

Tanada, Y., Kaya, H.K. 1993. Insect pathology. Academic Press. San Diego, California (USA).

Téllez–Jurado, A., Ramírez, M.G.C., Mercado Flores, Y., Torres, A.A., Arana–Cuenca A., 2009. Action and response mechanisms in relation of entomopathogenic fungi and insects. Rev. Mex. Mic., 30: 74-80.

Therville C., Cease A., Anderies J.M., Overson R., Trumper E.V., Medina H.E. 2020. Síntesis del taller de gobernanza sobre la langosta sudamericana. Informe técnico <https://drive.google.com/file/d/1PJleJkotm0-r7yMw3uGavB5N3hkjtYGU/view?usp=sharing>

Tranchini, E. 1995. Políticas Agrarias y Comportamientos Sociales: El Caso de la Plaga de Langosta en la Región Pampeana. Trabajo final de grado. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación.

Uvarov, B. 1977. Saltamontes y langostas, Vol. 2. Centro de Ultramar Pest Research, Londres, Reino Unido.

Valero-Jimenez, C.A., Debets, A.J.M., Van Kan, J.A.L., Schoustra, S.E., Takken, W., Zwaan, B.J., Koenraadt, C.J.M., 2014. Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malaria J.* 13: 479–487.

Van Driesche R.G., Hoddle M.S., Center T.D. 2007. Use of insect pathogens as pesticides. In: Van Driesche RG, Hoddle MS, Center TD (eds) *Control of pests and weeds by natural enemies*, Forest Health Technology Enterprise Team, New York, pp 443-462.

Vega, F.E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *J. Invertebr. Pathol.* 98: 277–279.

Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-ard, J.J., Blackwell, M., 2012. Fungal entomopathogens. In: Vega, F.E., Kaya, H.K. (Eds.), *Insect Pathology*. Elsevier, London, pp. 171–220.

Vinson, S.B., 1991. Suppression of the insect immune system by parasitic Hymenoptera. In: Pathak, J.P.N. (Ed.), *Insect Immunity*. Dordrecht, Boston and London: Kluwer Academic Publishers. pp. 171–187.

Waloff, Z.; Pedgley, D.E.. 1986. Comparative biogeography and biology of the South American locust, *Schistocerca cancellata*, and the South African locust, *S. gregariaflaviventris* (Orthoptera: Acrididae): a review. *Bull. Entomol. Res.*, 76: 1-20.

Wang, C., St. Leger R.J, 2007. The MAD1 adhesion of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachments to plants. *Eukaryotic Cell* 6: 808–816.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* Academic Press, San Diego CA., pp. 315–322.

Wright, E. R., Catenaccio, M. C., Medina, De Gracia, M., González Messina, L., Massola, M. P., Sugia, V. L., Sarubbi, C., Rivera, M. C., Folcia, A. M., Pérez, A., Varsallona, B., Moya, M. C., López, M. V., Fabrizio, M., Rodríguez Prados, R., Roca, M., Maldonado, C., Olivero, G., Ledesma, E., Maldonado, P., Pérez, J. C., Alizzi, J. E., Torres, P., Espinosa, L., González Bonorino, C., Acosta, A. y Costas, R. 2014. Investigación aplicada, transferencia e implementación de pautas para el control biológico de langostas con microorganismos nativos. Senasa. SNS 4: 55-60.

Xlstat life software, 2013. Addinsoft SARL Paris, france. <http://www.xlstat.com>

Zhang L., Lecoq M., Latchininsky A., Hunter D. 2019. Locust and Grasshopper Management. Ann. Rev. of Entomol., 64 (1): 15-34.