

Estudio de los endosimbiontes obligados,  
**“yeast-like symbionts”,**  
en la especie vectora  
***Delphacodes kuscheli***  
(Hemiptera: Delphacidae).

Efecto sobre el desempeño del vector y sobre la capacidad  
biocida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*



 **Daniela de la Fuente**  
TESIS DOCTORAL 2024

Directoras:  
**María Eugenia Brentassi**  
**Andrea Vanesa Toledo**

Facultad de Ciencias Naturales y Museo  
División Entomología  
Universidad Nacional de La Plata  
CONICET

Trabajo de tesis para optar al título  
de Doctora en Ciencias Naturales

## Agradecimientos

- Quiero agradecer especialmente a mis directoras Eugenia y Andrea por su guía, apoyo incondicional y dedicación a lo largo de todos estos años compartidos y por transmitirme su pasión por esta profesión.
- A Ana Marino por ayudarme, estar siempre y ser mi fuente inagotable de consultas.
- A la División Entomología por el espacio y lugar de trabajo, y a mis compañeros de laboratorio Nano, Mora, Susana, Álvaro y Bárbara por todos los momentos compartidos.
- A Francisco Giambelluca por el diseño del *software* utilizado para evaluar la coloración de la cutícula de los insectos.
- A Luis Giambelluca por haber brindado su ayuda en varios experimentos y en distintos momentos de la tesis.
- A Inés Catalano por recibirme en el Centro de Bioinvestigaciones de Pergamino, y a todos los integrantes del CeBIO por su cálida bienvenida. A Pablo Carpane por su paciencia y dedicación y por su supervisión y guía para realizar los ensayos de EPG.
- A Nicolás Pedrini por la supervisión y asistencia en uno de los ensayos realizados.
- A Virginia Diaz Villa y a Nicolas Flaibani por su predisposición y colaboración en los análisis estadísticos.
- A mi amiga Anabela de Maio por los diseños de la portada y carátulas de esta tesis.
- A Alexandra Elbakyan, quien hizo posible el acceso a gran parte de la bibliografía para llevar a cabo esta tesis.
- A Luis Genchi y todo el personal de la facultad por haber hecho siempre lo necesario para que pueda controlar ensayos diarios durante mucho tiempo.

- Al jurado de la tesis, las Dras. Romina Manfrino, Nancy Grego y Cristina Machado Assefh, por sus valiosos aportes y observaciones, fundamentales para enriquecer y mejorar la calidad de esta tesis.
- A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo y a la Universidad Nacional de La Plata en las que llevé a cabo mi formación de grado y postgrado.
- Al CONICET por haberme otorgado la beca doctoral y hacer posible de esta manera que realice la tesis.
- Y principalmente, a mi familia, a mis amigos y a mi novio, ¡GRACIAS!

## Índice

<b>Resumen</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	13

### **Capítulo 1: Introducción general, objetivos, hipótesis y predicciones**

<b>1.1 Introducción general</b> .....	18
1.1.1 Simbiosis entre microorganismos e insectos: una intrincada red de interrelaciones .....	18
1.1.2 Endosimbiontes mutualistas en Hemiptera Auchenorrhyncha .	19
1.1.3 Una asociación obligada para la supervivencia: Delphacidae y sus endosimbiontes fúngicos <i>yeast-like symbionts</i> .....	22
1.1.4 Biología y ecología del vector del virus del Mal de Río Cuarto <i>Delphacodes kuscheli</i> .....	25
1.1.5 <i>Beauveria bassiana</i> y su acción como agente de control biológico de <i>Delphacodes kuscheli</i> .....	29
<b>1.2 Objetivos</b> .....	32
<b>1.3 Hipótesis y predicciones</b> .....	33

### **Capítulo 2: Reducción del número de YLS de *Delphacodes kuscheli* mediante la aplicación de fungicidas sistémicos sobre plantas de avena**

<b>2.1 Introducción</b> .....	36
<b>2.2 Materiales y métodos</b> .....	40
2.2.1 Cría de insectos y cultivo de plantas .....	40
2.2.2 Pruebas preliminares .....	41
2.2.3 Fungicidas utilizados .....	41
2.2.4 Protocolo general de obtención de insectos y plantas experimentales .....	42

2.2.4.1 Reducción del número de YLS en ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con fungicidas, y extraídas al día 1, 3 y 5 .....	44
2.2.4.2 Reducción del número de YLS en adultos de 0-24 h provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con fungicidas .....	45
2.2.4.3 Reducción del número de YLS en adultos de 0-24 h provenientes de ninfas alimentadas desde el cuarto estadio sobre plantas tratadas con fungicidas .....	45
2.2.4.4 Reducción del número de YLS en hembras adultas alimentadas durante cinco días sobre plantas tratadas con fungicidas.....	46
2.2.4.5 Reducción del número de YLS en adultos de 3 días provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con el fungicida PT .....	46
2.2.4.6 Reducción del número de YLS en adultos de 7 días provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con el fungicida PT .....	47
2.2.5 Cuantificación de YLS .....	48
2.2.6 Análisis de datos .....	49
<b>2.3 Resultados .....</b>	<b>50</b>
2.3.1 Reducción del número de YLS en ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con fungicidas, y extraídas al día 1, 3 y 5 .....	50
2.3.2 Reducción del número de YLS en adultos de 0-24 h provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con fungicidas .....	52
2.3.3 Reducción del número de YLS en adultos de 0-24 h provenientes de ninfas alimentadas desde el cuarto estadio sobre plantas tratadas con fungicidas .....	54

2.3.4 Reducción del número de YLS en hembras adultas alimentadas durante cinco días sobre plantas tratadas con fungicidas .....	57
2.3.5 Reducción del número de YLS en adultos de 3 días provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con el fungicida PT .....	57
2.3.6 Reducción del número de YLS en adultos de 7 días provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con el fungicida PT .....	57
<b>2.4 Discusión</b> .....	58
<b>2.5 Anexo</b> .....	63

### **Capítulo 3: Efecto de la reducción del número de YLS sobre parámetros biológicos de *Delphacodes kuscheli***

<b>3.1 Introducción</b> .....	66
<b>3.2 Materiales y métodos</b> .....	69
3.2.1 Efecto de la reducción del número de YLS por fungicidas sistémicos sobre diferentes parámetros biológicos de <i>Delphacodes kuscheli</i> .....	69
3.2.2 Longevidad total de los insectos y longevidad de los adultos ...	71
3.2.3 Detección y cuantificación de ácido úrico .....	72
3.2.4 Coloración de la cutícula .....	72
3.2.5 Atributos reproductivos .....	74
3.2.6 Análisis de datos .....	75
<b>3.3 Resultados</b> .....	75
3.3.1 Efecto de la reducción del número de YLS por fungicidas sistémicos sobre diferentes parámetros biológicos de <i>Delphacodes kuscheli</i> .....	75
3.3.2 Longevidad total de los insectos y longevidad de los adultos ..	79
3.3.3 Detección y cuantificación de ácido úrico .....	80
3.3.4 Coloración de la cutícula .....	81

3.3.5 Atributos reproductivos .....	83
<b>3.4 Discusión .....</b>	<b>86</b>
<b>3.5 Anexo .....</b>	<b>95</b>

**Capítulo 4: Efecto de la reducción del número de YLS sobre el comportamiento alimentario de *Delphacodes kuscheli***

<b>4.1 Introducción .....</b>	<b>98</b>
<b>4.2 Materiales y métodos .....</b>	<b>103</b>
4.2.1 Insectos y plantas experimentales .....	104
4.2.2 Registro de EPG .....	104
4.2.3 Formas de onda de EPG .....	107
4.2.4 Análisis estadísticos .....	108
<b>4.3 Resultados .....</b>	<b>109</b>
<b>4.4 Discusión .....</b>	<b>116</b>

**Capítulo 5: Efecto de la reducción del número de YLS de *Delphacodes kuscheli* sobre la capacidad biocida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana***

<b>5.1 Introducción .....</b>	<b>122</b>
<b>5.2 Materiales y métodos .....</b>	<b>126</b>
5.2.1 Aislados de <i>Beauveria bassiana</i> CEP147 y CEP002 .....	126
5.2.2.1 Selección de fungicidas compatibles con el desarrollo de los aislados <i>B. bassiana</i> CEP147 y CEP002 .....	127
5.2.2.2 Análisis estadístico .....	128
5.2.3.1 Efecto de la reducción del número de YLS de <i>Delphacodes kuscheli</i> sobre la capacidad biocida de <i>Beauveria bassiana</i> . Ensayos de patogenicidad y virulencia .....	129
5.2.3.2 Análisis estadístico .....	131
<b>5.3 Resultados .....</b>	<b>132</b>

5.3.1 Selección de fungicidas compatibles con el desarrollo de los aislados <i>B. bassiana</i> CEP147 y CEP002 .....	132
5.3.2 Efecto de la reducción del número de YLS de <i>Delphacodes kuscheli</i> sobre la capacidad biocida de <i>Beauveria bassiana</i> . Ensayos de patogenicidad y virulencia .....	134
<b>5.4 Discusión</b> .....	139
<b>5.5 Anexo</b> .....	146

**Capítulo 6: Conclusiones generales, consideraciones finales y perspectivas futuras**

<b>6.1 Conclusiones generales</b> .....	149
<b>6.2 Consideraciones finales y perspectivas futuras</b> .....	151
<b>Bibliografía</b> .....	155

## Resumen

Los insectos establecen una amplia variedad de interacciones simbióticas con microorganismos, abarcando un espectro continuo y dinámico que va desde el mutualismo hasta el parasitismo. En este contexto, los insectos del orden Hemiptera, suborden Auchenorrhyncha, que se alimentan de la savia del xilema o floema de las plantas, se destacan por establecer interacciones mutualistas obligadas principalmente con bacterias. Estos microorganismos se denominan endosimbiontes, ya que residen dentro de tejidos o células especializadas del hospedero y desempeñan un papel crucial al complementar las dietas nutricionalmente deficientes de los insectos. Por este motivo, también se los llama endosimbiontes nutricionales. En particular, los representantes de la familia Delphacidae (subfamilia: Delphacinae) se distinguen porque sus endosimbiontes mutualistas obligados son hongos levaduriformes, conocidos como *yeast-like symbionts* (YLS). Los YLS se alojan en las células del cuerpo graso abdominal y se transfieren a la descendencia de forma transovarial, por lo cual, se encuentran en todas las etapas del desarrollo de los insectos. Anotaciones de genes metabólicos de los YLS del delfácido *Nilaparvata lugens*, una importante plaga del arroz en Asia, revelaron que estos endosimbiontes le proporcionan funciones complementarias al insecto hospedero en al menos tres aspectos: síntesis de aminoácidos esenciales, reciclaje de nitrógeno y síntesis de esteroides. En la Argentina, *Delphacodes kuscheli* es la principal especie vectora del Mal de Río Cuarto del maíz, enfermedad viral que afecta severamente a este cultivo. Dado que la manipulación de microorganismos que viven en simbiosis mutualistas con insectos es un recurso escasamente explorado que puede ser usado en el control de plagas, el objetivo general de este trabajo de tesis fue evaluar la respuesta biológica de *D. kuscheli* ante la reducción de sus YLS. A su vez, ya que el papel de los endosimbiontes nutricionales en la defensa de los hospederos contra sus enemigos naturales no ha sido

estudiado en profundidad y nunca se ha investigado en particular con endosimbiontes fúngicos, también se propuso evaluar la capacidad biocida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* ante la reducción de los YLS en el insecto hospedero. Para abarcar el objetivo general, se desarrollaron cuatro objetivos particulares detallados en los capítulos 2 al 5.

En el capítulo 2, se propuso desarrollar métodos efectivos y específicos para reducir el número YLS de *D. kuscheli*. Para lograrlo, se testearon los siguientes fungicidas sistémicos: protioconazol (Brumby® 480 SC, Bayer CropScience) (P), protioconazol y trifloxistrobin (CRIPTON® SC, Bayer CropScience) (PT), piraclostrobin y epoxiconazol (Opera®, BASF) (PE), piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad (Orquesta® Ultra, BASF) (PEF), picoxistrobin y ciproconazol (Stinger® SC, DuPont Agro) (PC) y tebuconazol (Tebuconazol® SC, Nufarm) (T). Los mismos fueron aplicados sobre las plantas de avena de las que se alimentó el insecto y se cuantificó el número de YLS en distintos estados (ninfas y adultos) y estadios (ninfas III y IV) de desarrollo del insecto. La combinación más exitosa en reducir el número de YLS en los adultos y obtener así insectos subsimbióticos fue utilizando los fungicidas P, PT y PC desde el tercer estadio ninfal, logrando más del 80% de reducción de YLS en hembras y más del 59% en machos.

En el capítulo 3, se evaluó el efecto de la reducción del número de YLS sobre distintos parámetros biológicos de *D. kuscheli*. Los resultados obtenidos mostraron que ante la reducción del número de YLS, en los insectos disminuyó la supervivencia ninfal, aumentó el tiempo de desarrollo ninfal, disminuyó el peso y largo de las hembras, se extendió la longevidad total de los insectos pero no se modificó la longevidad de los adultos, aumentó la concentración de ácido úrico (producto de desecho del metabolismo del nitrógeno que es metabolizado por los YLS), se aclaró y cambiaron los patrones de coloración de la cutícula de los insectos y disminuyó la fecundidad y fertilidad. Estos aportes en conjunto, contribuyen a comprender la importancia de los YLS en el éxito de este insecto plaga del maíz.

En el capítulo 4, se evaluó el efecto de la reducción del número de YLS sobre el comportamiento alimentario de *D. kuscheli*. Para esto, se aplicó la técnica *Electrical Penetration Graph* (EPG) que permitió analizar y cuantificar el comportamiento de exploración, prueba e ingestión de savia floemática que los insectos realizaron mediante la inserción de sus estiletes en plantas de avena sobre las que se alimentaron. Se observó que las hembras subsimbióticas de *D. kuscheli* demoraron mayor cantidad de tiempo en realizar la primera inserción de los estiletes en el tejido vegetal y en lograr la ingestión en el floema. A su vez, permanecieron menos tiempo ingiriendo savia floemática. A través de esta metodología, se obtuvo información sobre la interacción entre la planta hospedera y los insectos subsimbióticos, mostrando que la selección y explotación de la planta hospedera como recurso nutricional, no solo está determinada por las capacidades metabólicas de los propios insectos, sino que posiblemente también por sus endosimbiontes asociados.

En el capítulo 5 se evaluó el efecto de la reducción del número de YLS de *D. kuscheli* sobre la capacidad biocida de *B. bassiana*. Para esto se propuso en primer término encontrar un fungicida compatible con dos aislados de *B. bassiana* (CEP147 y CEP002) que a su vez redujera el número de YLS del insecto. Se seleccionó al fungicida PT para la obtención de insectos subsimbióticos ya que la compatibilidad con los aislados fúngicos fue mayor y se realizaron ensayos de patogenicidad y virulencia *in vivo* aplicando una suspensión de conidios de ambos aislados de *B. bassiana* sobre los insectos. La probabilidad de supervivencia y el tiempo hasta la muerte de los insectos fue menor en aquellos con carga natural de YLS expuestos a la suspensión de conidios de ambos aislados fúngicos, en comparación a los subsimbióticos. Los resultados de este capítulo desafían la concepción convencional de que la presencia de endosimbiontes confiere resistencia a sus hospederos ante los patógenos. La reducción de YLS parece haber desencadenado respuestas que mejoraron la capacidad

de *D. kuscheli* para enfrentar la infección por el hongo entomopatógeno *B. bassiana*.

En síntesis, en la presente tesis se exploraron diferentes aspectos de la interacción entre *D. kuscheli* y sus endosimbiontes obligados (YLS) que podrían ser utilizados en potenciales estrategias de control para reducir el impacto de esta plaga del maíz en la región. Se considera que las metodologías y técnicas seleccionadas para cumplir con los objetivos propuestos, podrían ajustarse y aplicarse también al estudio de otras especies de delfácidos y de hongos entomopatógenos.

## Abstract

Insects establish a wide variety of symbiotic interactions with microorganisms, covering a continuous and dynamic spectrum from mutualism to parasitism. In this context, insects of the order Hemiptera, suborder Auchenorrhyncha, which feed on the sap of the xylem or phloem of plants, stand out for maintaining mainly obligate mutualistic interactions with bacteria. These microorganisms are called endosymbionts, as they reside within specialized tissues or cells of the host and play a crucial role in supplementing the nutritionally deficient diets of insects. For this reason, they are also called nutritional endosymbionts. In particular, representatives of the family Delphacidae (subfamily: Delphacinae) are distinguished because their obligate mutualistic endosymbionts are yeast-like fungi, known as yeast-like symbionts (YLS). The YLS are located in the cells of the abdominal fat body and are transferred to offspring transovarially therefore, they are found in all stages of insect development. Annotations of metabolic genes from the YLS of the delphacid *Nilaparvata lugens*, an important rice pest in Asia, revealed that these endosymbionts provide complementary functions to the insect host in at least three aspects: essential amino acid synthesis, nitrogen recycling and sterol synthesis. In Argentina, *Delphacodes kuscheli* is the main vector of Mal de Río Cuarto, a viral disease that severely affects this crop. Considering that the manipulation of microorganisms living in mutualistic symbioses with insects is a scarcely explored resource that can be used in pest control, the main objective of this thesis was to evaluate the biological response of *D. kuscheli* in the face of the reduction of its YLS. Additionally, since the role of nutritional endosymbionts in host defense against their natural enemies has not been studied in depth, and never investigated in particular with fungal endosymbionts, it was proposed to evaluate the biocidal capacity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in response to the reduction of YLS in the host insect. To address

the general objective, four specific objectives were developed and detailed in chapters 2 to 5.

In Chapter 2, it was proposed to develop effective and specific methods to reduce the YLS number in *D. kuscheli*. To achieve this, the following systemic fungicides were tested: prothioconazole (Brumby® 480 SC, Bayer CropScience) (P), prothioconazole & trifloxystrobin (CRIPTON® SC, Bayer CropScience) (PT), pyraclostrobin & epoxiconazole (Opera®, BASF) (PE), pyraclostrobin, epoxiconazole & fluxapyroxad (Orquesta® Ultra, BASF) (PEF), picoxystrobin & cyproconazole (Stinger® SC, DuPont Agro) (PC) and tebuconazole (Tebuconazole® SC, Nufarm) (T). These fungicides were applied to the oat plants on which the insect feeds, and the number of YLS was quantified in different stages (nymphs and adults) and instars (nymphs III and IV) of the development of the insect. The most successful combination in reducing the number of YLS in adults and, thus obtaining sub-symbiotic insects, was using the fungicides P, PT and PC from the third nymphal stage, achieving over than 80% reduction of YLS in females and over than 59% in males.

In chapter 3, the effect of the reduction of the number of YLS on various biological parameters of *D. kuscheli* was evaluated. The results showed that in insects nymphal survival decreased, nymphal development time increased, weight and length of females decreased, total longevity of insects was extended but the was not modified longevity of adults, increased concentration of uric acid (a waste product of nitrogen metabolism that is metabolized by YLS), lightened and changed coloration patterns of insect cuticle, and decreased fecundity and fertility. Overall, these results help in understanding the importance of YLS in the success of this insect pest of maize.

In chapter 4, the effect of the reduction of the number of YLS on the feeding behavior of *D. kuscheli* was evaluated. For this, the Electrical Penetration Graph (EPG) technique was applied, which allowed us to analyze and quantify the exploration, testing, and phloem sap ingestion

behavior that the insects performed by inserting their stylets into oat plants on which they fed. It was observed that sub-symbiotic females of *D. kuscheli* took longer to perform the first insertion of the stylets into the plant tissue and to achieve ingestion in the phloem. Additionally, they spent less time ingesting phloem sap. Through this methodology, we obtained information on the interaction between the host plant and sub-symbiotic insects, showing that the selection and exploitation of the host plant as a nutritional resource is not only determined by the metabolic capabilities of the insects themselves, but possibly also by their associated endosymbionts.

In chapter 5, the effect of reducing the number of YLS of *D. kuscheli* on the biocidal capacity of *B. bassiana* was evaluated. For this, it was first proposed to find a fungicide compatible with two isolates of *B. bassiana* (CEP147 and CEP002) that in turn would reduce the number of YLS of the insect. The PT fungicide was selected to obtain subsymbiotic insects because of the compatibility with the fungal isolates was greater, and *in vivo* pathogenicity and virulence tests were carried out by applying a suspension of conidia of both *B. bassiana* isolates on the insects. The probability of survival and the time until death of the insects was lower in those with natural YLS load exposed to the suspension of conidia of both fungal isolates, compared to the sub-symbiotic ones. The results of this chapter challenged the conventional conception that the presence of endosymbionts confers resistance to their hosts against pathogens. YLS reduction appears to have triggered responses that improved the ability of *D. kuscheli* to cope with infection by the entomopathogenic fungus *B. bassiana*.

In summary, various aspects of the obligate symbiotic interaction *D. kuscheli* - YLS were explored in this thesis, which could be utilized in potential control strategies to reduce the impact of this maize pest in the region. It is considered that the selected methodologies and techniques to meet the proposed objectives could also be adjusted and applied to the

study of other species of delphacids and entomopathogenic fungi.

# CAPÍTULO 1



Introducción general,  
objetivos, hipótesis y predicciones



## 1.1 Introducción general

### 1.1.1 Simbiosis entre microorganismos e insectos: una intrincada red de interrelaciones

En la historia de nuestro planeta, las primeras formas de vida fueron los microorganismos. La evolución de los insectos se produce en un contexto en el que probablemente los microorganismos ya habían desarrollado todos los tipos de metabolismos conocidos para la obtención de nutrientes y energía, y colonizado todos los ambientes. Como resultado, los insectos evolucionaron en interacción constante con los microorganismos, lo que influyó profundamente en su éxito adaptativo, en la conquista de nuevos nichos ecológicos y en su diversificación (Douglas, 2009; Bennett y Moran, 2015; Estrela *et al.*, 2016; Cornwallis *et al.*, 2023).

El término **simbiosis** deriva del griego “*syn*” que significa juntos y “*bios*” que significa vida. Fue introducido por Albert Bernhard Frank (1877) y popularizado por Heinrich Anton de Bary (1879) para hacer referencia a la relación estrecha y duradera en la que están involucrados dos o más organismos de diferentes especies al menos en una etapa de su ciclo de vida (Klepzig *et al.*, 2009; Tipton *et al.*, 2019). Ambos autores utilizaron el término simbiosis para referirse a las interacciones entre especies que van desde el **mutualismo** donde las especies involucradas se benefician hasta el **parasitismo**, donde una especie se beneficia a expensas de la otra (Tipton *et al.*, 2019). Sin embargo, actualmente se entiende que estas categorías son parte de un espectro continuo y dinámico (Pérez-Brocal *et al.*, 2011). A raíz del reconocimiento de la importancia de las comunidades microbianas, se utiliza el término **holobionte** para hacer referencia a la unidad biológica formada por un organismo (en este caso el insecto) y su microbiota asociada (Margulis, 1990; Gordon *et al.*, 2013; Guerrero *et al.*, 2013).

En una asociación simbiótica entre microorganismos e insectos, se denomina a los participantes simbiote y hospedero respectivamente. A su vez, dependiendo de la ubicación de los simbiotes, se los clasifica como ectosimbiontes si se encuentran fuera del cuerpo del hospedero, por ejemplo sobre la superficie de la cutícula/tegumento, o como **endosimbiontes** si se alojan internamente, ya sea de forma extracelular o intracelular, pudiendo hallarse en el tracto digestivo o en tejidos y células del hospedero (Margulis y Chapman, 1998; Vega y Dowd, 2005; Gibson y Hunter, 2010).

Los insectos ofrecen un excelente modelo biológico para investigar las relaciones simbióticas con microorganismos debido a que son el grupo de animales más exitoso en la Tierra, tanto en cantidad de especies como en número de individuos, ocupan los más diversos ambientes, algunos presentan ciertas facilidades para ser criados en laboratorio y ciclos de vida relativamente cortos, y poseen una gran tolerancia a organismos foráneos, lo que les permite coexistir con una gran variedad de microorganismos (Grijalva y Giraldo, 2006; Gupta y Nair, 2020). Particularmente, entre los insectos que se alimentan de la savia del xilema y floema pertenecientes al orden **Hemiptera**, suborden **Auchenorrhyncha**, se encuentran los sistemas de **endosimbiosis mutualistas** más extraordinarios de todos los insectos (Buchner, 1965; Sapp, 2002; Moran *et al.*, 2005).

### **1.1.2 Endosimbiontes mutualistas en Hemiptera Auchenorrhyncha**

Antes de que estuvieran disponibles los métodos moleculares, el investigador Paul Buchner (1965) y sus colaboradores llevaron a cabo estudios donde encontraron una gran diversidad de asociaciones entre microorganismos y diferentes grupos de invertebrados, con especial atención en los insectos que se alimentan de savia. Una de las causas de la abundancia de interacciones simbióticas en estos insectos es que la savia del floema y del xilema es deficiente desde el punto de vista nutricional, ya

que en su composición escasean los aminoácidos esenciales y, en el caso de la savia del xilema, también las vitaminas y carbohidratos (Mattson, 1980; Douglas, 2006). Buchner, sostenía la idea de que los microorganismos simbióticos compartían largas historias evolutivas con sus hospederos y también la premisa de que el papel principal de los simbioses era proporcionar a los insectos los nutrientes faltantes en sus dietas (Moran, 2007). Particularmente, los Auchenorrhyncha muestran una notable diversidad de asociaciones simbióticas y Buchner se refirió a este grupo como "*fairy land of insect symbioses*".

El suborden Auchenorrhyncha comprende a las superfamilias Cicadoidea, Cercopoidea, Membracoidea y Fulgoroidea, las cuales incluyen a los insectos fitófagos conocidos comúnmente como "**chicharritas**". Se distinguen por presentar sus piezas bucales modificadas en forma de estiletes, que emplean para perforar los tejidos vegetales e ingerir la savia del xilema y floema (Cook y Denno, 1994; Hansen y Moran, 2013; Ankrah et al., 2020). Moran et al. (2005) hipotetizaron que el ancestro común de los Auchenorrhyncha fue colonizado por un endosimbionte bacteriano hace 280-260 Ma, el cual coevolucionó con sus insectos hospederos dando origen a la bacteria actualmente conocida como *Candidatus Sulcia muelleri* (en adelante *Sulcia*) (Phylum: Bacteroidetes). *Sulcia* suele estar acompañada de otro u otros endosimbiontes adicionales, pero en algunos linajes de Auchenorrhyncha, se pierde o es reemplazada por otras bacterias u hongos (Bennett y Moran, 2013; Gil y Latorre, 2019; Michalik et al., 2023; Brentassi y de la Fuente, 2024).

Tradicionalmente los endosimbiontes de Auchenorrhyncha se agrupan en dos categorías: **simbioses primarios y secundarios** (Baumann, 2005; Feldhaar, 2011; Douglas, 2015; Gil y Latorre, 2019). En las asociaciones entre insectos y **endosimbiontes primarios** los microorganismos viven en el interior de células del hospedero llamadas bacteriocitos o micetocitos, según alojen bacterias u hongos, y forman órganos conocidos como bacteriomas o micetomas respectivamente. Los

endosimbiontes también pueden alojarse intracelularmente en células del cuerpo graso ubicadas en el abdomen de los insectos. Estos microorganismos se transmiten verticalmente a la descendencia y tienen genomas muy reducidos (<1 Mb) (Bennett y Moran, 2013; Latorre y Manzano-Marín, 2017). Como postuló Buchner (1965), la principal función de estos microorganismos es la de proporcionar los nutrientes esenciales que los insectos no pueden sintetizar por sí mismos. Se considera que los endosimbiontes primarios son **mutualistas**. Los beneficios que les aportan al insecto fueron claramente definidos, y los microorganismos a cambio, obtienen un entorno estable dentro del hospedero con una provisión permanente de recursos. Las asociaciones basadas en las necesidades metabólicas entre los endosimbiontes primarios y sus hospederos son generalmente **obligadas** para ambos. El insecto depende de sus simbiontes para la supervivencia, el desarrollo y la reproducción, y el simbionte, suele perder los genes necesarios para la vida libre a lo largo de la evolución, por lo que también muestra una alta congruencia filogenética con su hospedero (Baumann, 2005; Husnik y Keeling, 2019). En gran medida, la capacidad de los endosimbiontes primarios para proporcionar los nutrientes esenciales que faltan en la savia del xilema y floema, permitió a los insectos fitófagos picadores succionadores acceder a estas dietas tan especializadas y restrictivas (Janson *et al.*, 2008; Sudakaran *et al.*, 2015; Skidmore y Hansen, 2017).

Por otro lado, los **endosimbiontes secundarios** suelen considerarse **facultativos** desde la perspectiva del hospedero, ya que no son indispensables para su supervivencia. La naturaleza de estas interacciones es variada y, en muchos casos, resulta complejo determinar si los endosimbiontes facultativos son beneficiosos o perjudiciales para el insecto. Estos microorganismos no se limitan a residir en tejidos especializados del insecto, sino que también pueden alojarse extracelularmente en el hemocele, el intestino o en intersticios del cuerpo graso, y su transmisión puede llevarse a cabo tanto vertical como

horizontalmente. En consecuencia, su presencia puede ser solo esporádica o bien, pueden haberse establecido de manera permanente en las poblaciones de la especie hospedera (Feldhaar, 2011). Además, no muestran una alta congruencia filogenética con su hospedero, pudiendo asociarse con varios taxones de insectos (Masson y Lemaitre, 2020; Cornwallis *et al.*, 2023). Los endosimbiontes secundarios facultativos con frecuencia confieren rasgos ecológica y fisiológicamente importantes para los insectos. Entre las funciones que pueden aportar en beneficio del insecto se mencionan algunos ejemplos: **(i)** Protección de su hospedero excluyendo competitivamente a los patógenos o a través de la producción de compuestos bioactivos contra bacterias, hongos, virus, parásitos o depredadores (Flórez *et al.*, 2015). **(ii)** Detoxificación de insecticidas y/o tolerancia a los insecticidas para los insectos (Blanton y Peterson, 2020). **(iii)** Suplemento de aminoácidos y vitaminas que potencian el bienestar general de su hospedero (Zhang *et al.*, 2019). **(iv)** Aumento de la tolerancia ante condiciones ambientales cambiantes o perjudiciales para el insecto (Montllor *et al.*, 2002). **(v)** Selección de plantas hospederas (Tsuchida *et al.*, 2004).

La mayoría de los estudios de endosimbiosis mutualistas obligadas en insectos se centran en las comunidades bacterianas de la microbiota por ser las más frecuentes (Moran *et al.*, 2003; Urban y Cryan, 2012; Gurung *et al.*, 2019). Una de las excepciones se presenta en los miembros de la familia Delphacidae (subfamilia: Delphacinae), donde *Sulcia* se pierde y los endosimbiontes mutualistas obligados son hongos, llamados comúnmente ***yeast-like symbionts* (YLS)**.

### **1.1.3 Una asociación obligada para la supervivencia: Delphacidae y sus endosimbiontes fúngicos *yeast-like symbionts***

La familia Delphacidae es la más diversa dentro del infraorden Fulgoromorpha, presentando una distribución cosmopolita. Se han

reconocido más de 2226 especies pertenecientes a esta familia (Barringer *et al.*, 2019) y la mayoría de ellas se alimenta de la savia del floema de distintas monocotiledóneas (Cook y Denno, 1994). Los delfácidos se distinguen de otras chicharritas por el prominente espolón o calcar móvil en la tibia del tercer par de patas (Remes Lenicov y Paradell, 2012). La mayoría de las especies tienen dimensiones menores a los 5 mm y exhiben dimorfismo alar, algunos ejemplares pueden ser macrópteros, con alas completamente desarrolladas y otros braquípteros, con alas reducidas más cortas (Denno y Roderick, 1990).

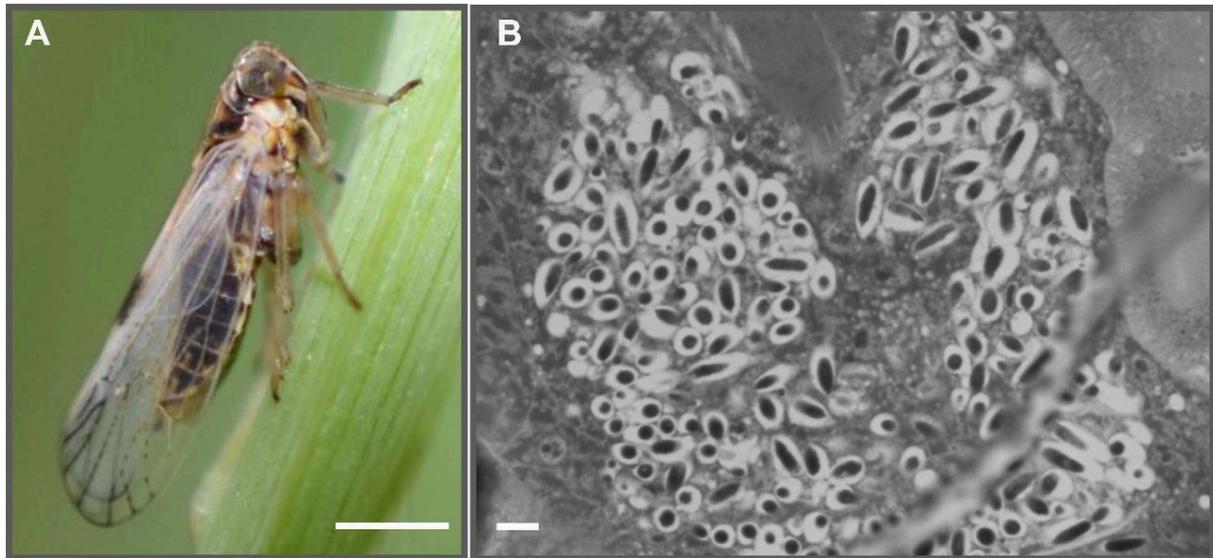
Además de su importancia biológica, los delfácidos también tienen una implicancia económica significativa. Si bien existen especies beneficiosas, como aquellas que se alimentan de malezas o plantas invasoras (Grevstad *et al.*, 2003; Sosa *et al.*, 2007), otras son plagas devastadoras de los principales cultivos agrícolas (arroz, maíz, trigo, sorgo y caña de azúcar) a nivel mundial (Denno y Roderick, 1990; Wilson, 2019, Rodríguez-Juárez *et al.*, 2020, Iamba y Dono, 2021). Estas últimas provocan daños directos en las plantas a través de la alimentación y oviposición (Sōgawa y Cheng, 1979) y/o pueden actuar como vectores de patógenos vegetales (Nault y Ammar, 1989; Wilson, 2005).

En los últimos años, se ha puesto en evidencia la importancia de los endosimbiontes fúngicos y bacterianos en la biología de las especies plaga, las cuales han desarrollado resistencia a los cultivares e insecticidas utilizados para su control desde la Revolución Verde (Ferrater *et al.*, 2013). El mayor número de investigaciones acerca de la función que desempeñan los endosimbiontes mutualistas en estos insectos se ha llevado a cabo en chicharritas plagas del arroz en Asia, como *Nilaparvata lugens* (Stål), *Sogatella furcifera* (Horváth) y *Laodelphax striatellus* (Fallén). Estas chicharritas se encuentran asociadas a los hongos endosimbiontes obligados **yeast-like symbionts (YLS)** (Noda, 1974). Si bien su nombre refiere a que son microorganismos morfológicamente semejantes a levaduras, estudios moleculares y filogenéticos realizados por Suh *et al.*

(2001), los colocaron dentro del orden Hypocreales, donde también se encuentran otros hongos filamentosos patógenos de insectos. Se ha registrado a los YLS principalmente concentrados dentro de células del cuerpo graso abdominal de ninfas y adultos de las chicharritas, como así también en sus huevos (Chen *et al.*, 1981a). Los YLS son bastoniformes, miden entre 10- 12  $\mu\text{m}$  de largo y se multiplican por gemación, ya que perdieron la capacidad de reproducirse sexualmente (Fan *et al.*, 2015). A su vez, se transmiten exclusivamente por vía materna a la descendencia a través de los ovocitos, lo que se conoce como transmisión transovarial. Por exocitosis, salen del cuerpo graso donde se encuentran alojados, se liberan al hemocele e ingresan al ovocito primario que originará al huevo (Cheng y Hou, 2001). A partir de la secuenciación genómica de los YLS de *N. lugens*, Xue *et al.* (2014) postularon que estos endosimbiontes mutualistas proporcionan funciones complementarias al insecto hospedero en al menos tres aspectos: **síntesis de aminoácidos esenciales, reciclaje de nitrógeno y síntesis de esteroides**. Es por este motivo que se los caracteriza como **endosimbiontes nutricionales**. Además, Lee y Hou (1987) sugirieron que los YLS suministran proteínas para el desarrollo embrionario y postembrionario normal de su hospedero y que son necesarios para la correcta segmentación abdominal y la diferenciación del embrión de su hospedero.

En la Argentina, se encuentra la especie de chicharrita ***Delphacodes kuscheli*** Fennah 1955, nombre original propuesto por el autor, aunque su posición taxonómica a nivel genérico aún está en revisión (Remes Lenicov *et al.*, 2008). *D. kuscheli* es una de las plagas de insectos más significativa de la producción de maíz (*Zea mays* L.) (Lenardón *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 2018). En los últimos años, inició en la División Entomología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP) la línea de investigación que estudia a los YLS asociados a este delfácido con el objetivo de ampliar el conocimiento de la biología del insecto y, además, evaluar la posibilidad de incorporar a los endosimbiontes en las estrategias de control existentes

para el manejo de esta plaga (Brentassi *et al.*, 2014, 2017, 2020; Liljesthröm *et al.*, 2017; de la Fuente *et al.*, 2019, 2021). En la **figura 1.1** se presenta la especie objeto de estudio de esta tesis y sus endosimbiontes mutualistas obligados, *yeast-like symbionts*.



**Fig 1.1. Sistema de estudio.** (A) Ejemplar hembra de *Delphacodes kuscheli*, escala 1mm (Foto: Andrea Toledo). (B) Corte histológico observado con microscopía óptica. Detalle de los YLS formando agregados en el cuerpo graso abdominal del insecto, escala 10  $\mu$ m. Tomada de Brentassi *et al.* (2014).

#### 1.1.4 Biología y ecología del vector del virus del Mal de Río Cuarto *Delphacodes kuscheli*

*Delphacodes kuscheli* es el principal vector del Mal de Río Cuarto, una de las enfermedades virales que más afecta al cultivo de maíz en la Argentina (Remes Lenicov *et al.*, 1985; Argüello Caro *et al.*, 2013; Dumón *et al.*, 2022; Torrico *et al.*, 2022). El agente etiológico de la enfermedad pertenece al género *Fijivirus* de la familia Reoviridae (Distéfano *et al.*, 2002) y los síntomas visibles en la planta de maíz según el grado de severidad son los siguientes: aparición de agallas o “enaciones” en las hojas, acortamiento de los entrenudos del tallo, hojas superiores reducidas a sus

vainas, panojas reducidas, plantas achaparradas, espigas muy chicas con pocos granos y deformes, y generación de múltiples espigas (Giménez Pecci *et al.*, 2012). El **virus del Mal de Río Cuarto (MRCV)** exhibe un amplio rango de plantas hospederas. Además del maíz, se ha detectado en trigo (*Triticum aestivum* L.), avena (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), centeno (*Secale cereale* (L.) M.Bieb.), sorgo (*Sorghum vulgare* L.), mijo (*Panicum miliaceum* L.) y diversas gramíneas silvestres que crecen en el agroecosistema del maíz, muchas de las cuales son consideradas malezas (Rodríguez Pardina *et al.*, 1998; Laguna *et al.*, 2002). Estas gramíneas actúan como reservorios naturales del virus y contribuyen al crecimiento poblacional del insecto vector. Aunque *D. kuscheli* desarrolla picos poblacionales en avena durante la primavera, también se reproduce sobre trigo, cebada y varias gramíneas (Remes Lenicov *et al.*, 1991; Remes Lenicov y Virla, 1999), sin embargo, no se reproduce con éxito en el maíz (Virla y Remes Lenicov, 1991). La forma de transmisión del virus es persistente, circulativa y propagativa (Truol *et al.*, 2001). Ocurre cuando los adultos macrópteros infectados migran para alimentarse de plantas jóvenes de maíz debido a la senescencia o la cosecha de avena, la cual es su planta hospedera invernal más importante (Remes Lenicov *et al.*, 1991; Boito y Ornaghi, 2008). El insecto adquiere el virus que se encuentra en el floema de una planta infectada después de un período prolongado de alimentación. Posteriormente, tras un tiempo de latencia en el que el virus se replica dentro del vector, el insecto es capaz de transmitirlo a lo largo de toda su vida, infectando así a nuevas plantas a través de la alimentación. Durante este proceso, mientras el insecto se alimenta succionando savia del floema, inyecta saliva infectada en las plantas sanas (Arneodo *et al.*, 2002). Tanto adultos como ninfas son capaces de transmitir el virus (Arneodo *et al.*, 2005).

A finales de la década de 1960, se detectó la enfermedad por primera vez en los cultivos de maíz en la región de Río Cuarto, Córdoba, y luego se la encontró todos los años con mayor o menor intensidad sobre este

cultivo, por lo que se la considera una enfermedad endémica de esa zona (Rodríguez Pardina *et al.*, 1998; Giménez Pecci *et al.*, 2012 ). Posteriormente, causó pérdidas millonarias principalmente en los brotes ocurridos durante las campañas 1981/82, 1996/97, 2006/07 extendiéndose a toda la región maicera del país (Lenardón *et al.*, 1998, 2007; Informe Técnico Pioneer, 2007). El MRCV también ha sido reportado en Uruguay (Ornaghi *et al.*, 1999). En la actualidad, el aumento de la población del vector en la zona endémica de la enfermedad, ha vuelto a generar preocupación (Dumón *et al.*, 2022; Torrico *et al.*, 2022 ).

La especie *D. kuscheli* fue recolectada y descrita en la isla Juan Fernández, Chile (Fennah, 1955). Posteriormente, Remes Lenicov y Tesón (1978) y Remes Lenicov *et al.* (2000) la citan por primera vez para la Argentina y Uruguay, respectivamente. A partir de entonces, numerosas contribuciones documentaron varios aspectos de la biología y la ecología de este vector del MRCV. Se la considera una especie neotropical, ya que solo se la ha registrado en estos tres países. En la Argentina se la ha encontrado en las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Chaco, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, San Luis, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, Buenos Aires, La Pampa, Neuquén y Río Negro (Laguna *et al.*, 2002; Remes Lenicov y Paradell, 2012). El ciclo de vida del insecto comprende el estado de huevo, que son insertados dentro del tejido vegetal, y cinco estadios ninfales hasta llegar al estado adulto. Se ha observado que está presente durante todo el año en la zona de Río Cuarto y que es una especie multivoltina, desarrollando al menos tres o cuatro generaciones por año (Remes Lenicov *et al.*, 1991). Se han realizado predicciones de su nivel poblacional mediante modelos meteorológicos (Ornaghi *et al.*, 2011), se ha evaluado su dinámica poblacional en distintos cereales de invierno (Boito y Ornaghi, 2008), así también como su variación geográfica (Grilli y Gorla, 2002; Grilli y Bruno, 2007). Además, se han llevado a cabo investigaciones sobre el desempeño del vector en diferentes plantas hospederas (Virla y Remes Lenicov, 1991), su comportamiento alimentario (Brentassi y Remes

Lenicov, 2007; Brentassi *et al.*, 2019) y reproductivo (Brentassi y Remes Lenicov, 1999). También se ha probado la resistencia de las plantas hospederas al vector (Costamagna *et al.*, 2005) y el efecto del uso de insecticidas sistémicos en semillas de maíz para el control del insecto (March *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2018).

Las estrategias que se están implementando en la actualidad para el control del MRCV se enfocan en tres aspectos principales: la fecha de siembra del maíz, con el objetivo de prevenir los picos poblacionales del vector, el uso de variedades de maíz resistentes al virus y el control químico del vector *D. kuscheli* (Giménez Pecci *et al.*, 2012). Son muchos los factores que regulan o afectan la incidencia y severidad del MRCV dentro del cultivo. En su gran mayoría, se relacionan con: (i) el aumento poblacional de la chicharrita por distintos motivos (inviernos benignos, vientos y migraciones que facilitan su dispersión, disponibilidad de plantas hospederas), (ii) la carga viral dentro del vector, (iii) cuán resistente es la planta en el momento de desarrollo en que es infectada (muy sensible en estadios tempranos), (iv) el efecto de factores de estrés que puedan bajar la tolerancia del cultivar (sequía, anegamientos temporarios, acción de herbicidas, daños mecánicos, daños por otros insectos). Todos estos factores contribuyen a aumentar la predisposición a la enfermedad y, cuando varios de ellos actúan al mismo tiempo, pueden ocurrir las severas epidemias que ocasionalmente se presentan (Presello *et al.*, 1996; Informe Técnico Pioneer, 2007).

Este contexto, puso en evidencia la necesidad de sumar nuevas alternativas para el control de la enfermedad y fundamentalmente de los insectos transmisores. Con este propósito, inició hace más de una década la línea de investigación que explora a los YLS asociados a *D. kuscheli* mencionada anteriormente, y que se sumó al estudio de los enemigos naturales de *D. kuscheli* como parasitoides (Liljeström y Virla, 2004; Virla, 2004) y hongos entomopatógenos (Toledo *et al.*, 2007, 2011). En cuanto a estos últimos, se investigó la potencialidad de varias especies fúngicas del

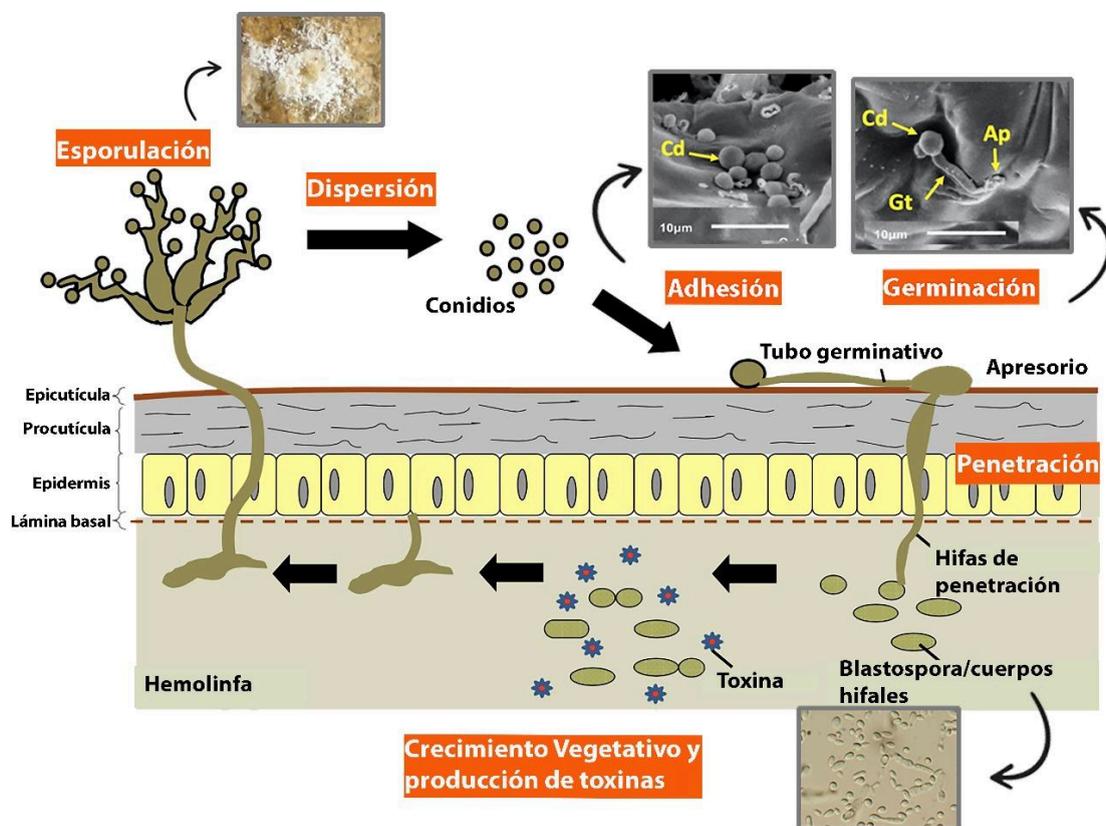
orden Hypocreales como agentes de control biológico de *D. kuscheli* y se destacó a ***Beauveria bassiana*** (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota: Cordycipitaceae) por mostrar una reducción eficaz en la supervivencia del insecto bajo condiciones controladas en laboratorio (Toledo *et al.*, 2007).

### **1.1.5 *Beauveria bassiana* y su acción como agente de control biológico de *Delphacodes kuscheli***

En la naturaleza, los insectos no solo establecen simbiosis mutualistas con microorganismos, sino que también se enfrentan a una gran variedad de patógenos que les causan daño o incluso la muerte (Aronson *et al.*, 1986). Un ejemplo notable es la interacción entre insectos y hongos entomopatógenos. La mayoría de las especies de hongos entomopatógenos se ubican en la división Entomophthoromycota y Ascomycota, siendo esta última a la que pertenece *B. bassiana* (Mascarin y Jaronski, 2016). Estos hongos, desempeñan un papel crucial en la regulación de las poblaciones de insectos en su entorno natural y por ende en la conservación del equilibrio ecológico (Meyling y Eilenberg, 2007; Sánchez-Peña *et al.*, 2011; Augustyniuk-Kram y Kram, 2012).

El ciclo de infección de *B. bassiana* se desarrolla en siete etapas sobre el insecto hospedero: adhesión, germinación, penetración, colonización, muerte, reproducción y diseminación. En su mayoría, los hongos contactan al insecto y penetran a través de la cutícula, que resulta ser la primera línea de defensa (Siva-Jothy *et al.*, 2005). Durante los primeros pasos de la infección, los conidios fúngicos se adhieren a la superficie cuticular por mecanismos hidrofóbicos y electrostáticos. Varios aislados también secretan sustancias mucosas que ayudan a la adsorción de los conidios y comienzan la disolución de la cutícula (Pedrini, 2018). La germinación de los conidios puede ocurrir si el microclima cuticular es adecuado. Para penetrar la cutícula, los hongos entomopatógenos forman estructuras especializadas denominadas apresorios. Estas células forman a

su vez las hifas de penetración que utilizan una combinación de mecanismos enzimáticos y mecánicos (de presión) para atravesar las diferentes capas cuticulares y alcanzar la hemolinfa. Una vez dentro de la cavidad del insecto, el hongo cambia a un tipo celular diferente, llamado blastospora o cuerpo hifal. Las blastosporas son estructuras unicelulares o multicelulares delimitadas por tabiques que pueden multiplicarse rápidamente dentro de la hemolinfa. Explotan los nutrientes, colonizan los tejidos internos y tienen el potencial para evadir el sistema inmune del hospedero, ya que poseen una pared celular delgada sin  $\beta$ -glucanos para actuar como camuflaje (de Oliveira Barbosa Bitencourt *et al.*, 2023). El insecto muere debido a la obstrucción física de las cavidades y el agotamiento de nutrientes por la invasión de blastosporas en tejidos y órganos y en algunos casos por la liberación de toxinas (Mascarin y Jaronski, 2016). Finalmente, las hifas del hongo atraviesan la cutícula desde el interior hasta el exterior del insecto, dando inicio a la formación de conidios y permitiendo así la continuación del ciclo de infección (Pucheta Díaz *et al.*, 2006) (**Fig. 1.2**).



**Fig. 1.2. Ciclo de infección de *Beauveria bassiana* en insectos.** Un conidio debe adherirse al insecto huésped. En condiciones favorables comienza la germinación y la producción de un tubo germinal. Se emplea presión mecánica y enzimas para romper la cutícula. El hongo sufre una diferenciación morfogénica y cambia al estado de blastosporas para colonizar el hemocele del huésped, donde secreta toxinas y se alimenta de azúcares en la hemolinfa. Las blastosporas evaden o superan las respuestas inmunes del huésped y secretan toxinas que facilitan la muerte del insecto. Después de que el hospedero muere, el hongo vuelve a romper la cutícula desde el interior y esporula en el cadáver. Modificado de Mascarín y Jaronski (2016).

Dentro de los Ascomycota, *B. bassiana* ha adquirido destacada relevancia a nivel mundial por ser un hongo patógeno especializado en la infección de artrópodos (Valero-Jiménez *et al.*, 2016). Su importancia radica en su capacidad para controlar desde vectores de enfermedades humanas (Darbro *et al.*, 2012; Forlani *et al.*, 2015) hasta una amplia variedad de plagas forestales (Skrzecz *et al.*, 2016) y agrícolas (Lacey *et al.*, 2015), incluyendo a la chicharrita *D. kuscheli* (Toledo *et al.*, 2007). En muchos casos, suele ser específico contra los insectos blanco, minimizando su impacto en otros agentes de control biológico como ser depredadores, parásitos u otros patógenos (Zimmermann, 2007). Su utilización se alinea y es compatible con el manejo integrado de plagas (Ownley *et al.*, 2004), ya que, al ser un agente de control biológico, puede reducir la dependencia de los insecticidas químicos y contribuye a mantener el equilibrio natural en los agroecosistemas. A su vez, su uso también es compatible con algunos fungicidas y muchos otros tipos de pesticidas (Alizadeh *et al.*, 2007; Shah, *et al.*, 2009 ). Además, este entomopatógeno es seguro para el medio ambiente, ya que no deja residuos tóxicos en los cultivos ni contamina recursos naturales como el suelo, el agua o el aire. Por tanto, *B. bassiana* se ha convertido en una herramienta interesante para incorporar en el control de insectos, brindando una alternativa segura para proteger los cultivos de

los insectos plaga, reducir el uso de pesticidas químicos y fomentar prácticas agrícolas sostenibles (de Faria y Wraight, 2007).

## 1.2 Objetivos

### Objetivo general

La manipulación de microorganismos que viven en simbiosis mutualistas con insectos es un recurso sin explotar que puede emplearse en el control de plagas. En la presente tesis se planteó utilizar como modelo biológico a *D. kuscheli* por ser el principal vector del virus del Mal de Río Cuarto en el país y a *B. bassiana* por ser un patógeno efectivo contra esta chicharrita.

El objetivo general de este trabajo de tesis fue evaluar la respuesta biológica de *D. kuscheli* ante la reducción de sus endosimbiontes mutualistas fúngicos, los YLS, mediante la aplicación de fungicidas sistémicos. A su vez, debido a que el papel de los endosimbiontes nutricionales en la defensa de los hospederos contra sus enemigos naturales no ha sido estudiado en profundidad y a la actualidad, no existen estudios realizados con endosimbiontes fúngicos, se propuso evaluar la capacidad biocida del hongo entomopatógeno *B. bassiana* ante la disminución de los YLS en el insecto hospedero, planteando la posibilidad de utilizar en forma conjunta a este enemigo natural del insecto y fungicidas sistémicos compatibles.

La finalidad de este trabajo de investigación fue explorar distintos aspectos de las interacciones simbióticas de *D. kuscheli* que podrían ser utilizados en potenciales estrategias de control para reducir el impacto de esta plaga del maíz en la región. Se considera que las metodologías y técnicas seleccionadas para cumplir con los objetivos propuestos, podrían ajustarse y aplicarse también al estudio de otras especies de delfácidos y de hongos entomopatógenos.

## Objetivos específicos

- Desarrollar métodos para reducir el número de endosimbiontes mutualistas fúngicos (YLS) de *D. kuscheli* mediante fungicidas sistémicos aplicados a las plantas hospederas.
- Evaluar el efecto de la reducción del número de YLS sobre parámetros biológicos de *D. kuscheli*.
- Evaluar el efecto de la reducción del número de YLS sobre el comportamiento alimentario de *D. kuscheli*.
- Evaluar el efecto de la reducción del número de YLS de *D. kuscheli* sobre la capacidad biocida del hongo entomopatógeno *B. bassiana*.

### 1.3 Hipótesis (H) y predicciones (P)

**H1:** Los fungicidas sistémicos asperjados sobre las plantas de avena de las que *D. kuscheli* se alimenta, afectan a sus endosimbiontes fúngicos mutualistas obligados, los YLS. El efecto de estos fungicidas sobre el número de YLS, depende del tiempo de exposición y del estado de desarrollo en el que los insectos fueron expuestos a los mismos.

**P1:** El número de YLS será menor en insectos que se alimentan de plantas tratadas con fungicidas sistémicos, obteniéndose de esta manera insectos subsimbióticos. Asimismo, insectos expuestos mayor cantidad de tiempo a los fungicidas y desde menores estados de desarrollo, tendrán un menor número de YLS.

**H2:** Dada la participación de los YLS en la síntesis de aminoácidos, el reciclaje de nitrógeno y la síntesis de esteroides, la reducción en el número de estos endosimbiontes perjudica diversos aspectos de la biología de *D. kuscheli*.

**P2:** La reducción del número de YLS aumentará el tiempo de desarrollo ninfal y disminuirá la supervivencia ninfal, la longevidad de los adultos, el

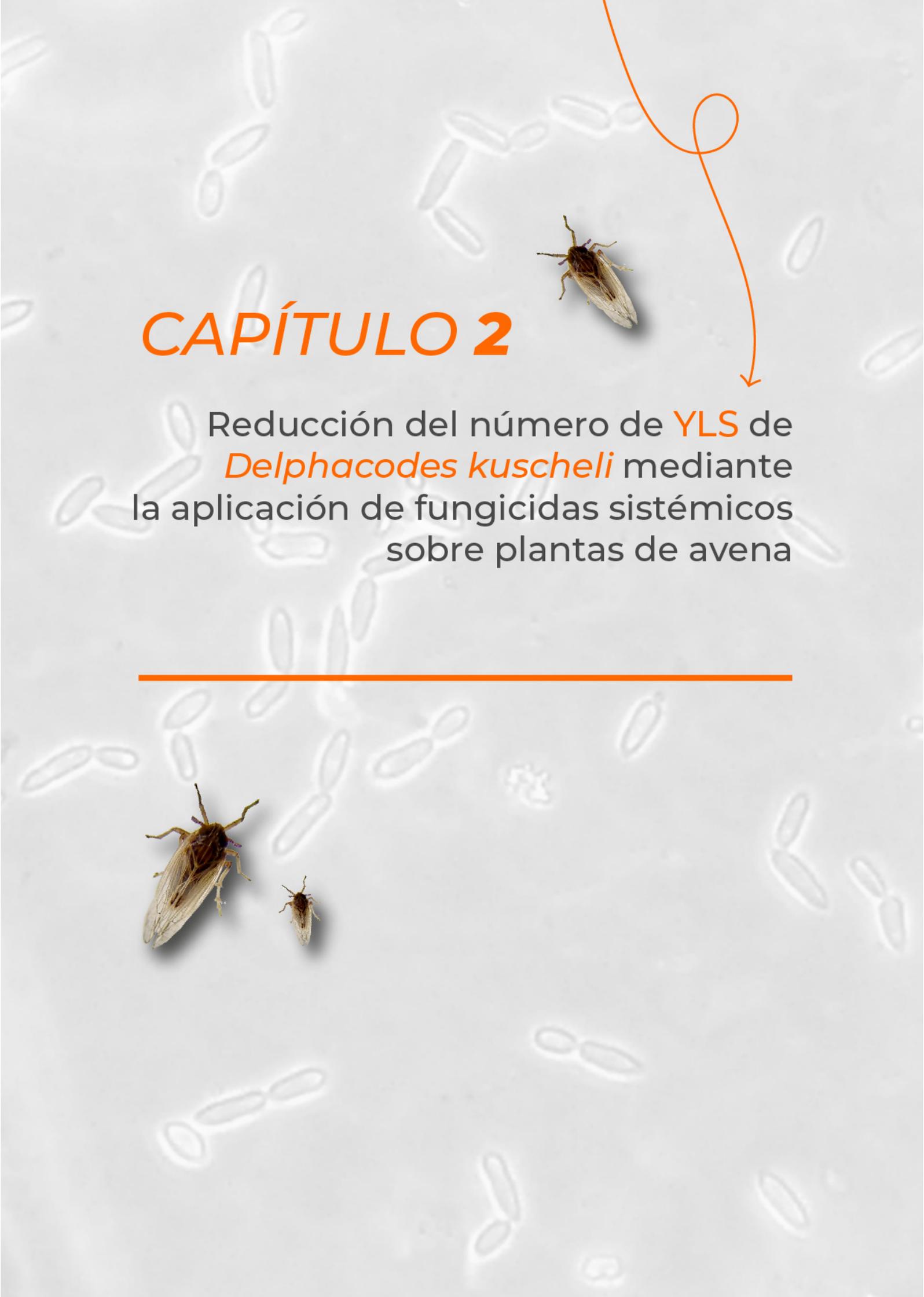
tamaño y peso individual de los adultos, la coloración de la cutícula, la fecundidad y la fertilidad. Además, aumentará el contenido de ácido úrico en los tejidos del insecto, debido a que los YLS son responsables de metabolizarlo.

**H3:** Dada la importancia de los YLS como complemento en la nutrición del insecto, la reducción de su número afecta el comportamiento alimentario de *D. kuscheli*

**P3:** La reducción del número de YLS disminuirá el suministro adicional de nutrientes aportado por los endosimbiontes, por lo que los insectos permanecerán mayor cantidad de tiempo alimentándose del floema para cubrir sus necesidades fisiológicas.

**H4:** La reducción del número de YLS provoca un desbalance nutricional en *D. kuscheli*, lo que impacta en la conformación y estructura de su cutícula, por lo que resulta más susceptible al ataque de *B. bassiana*.

**P4:** La reducción del número de YLS disminuirá la probabilidad de supervivencia y el tiempo necesario para causar la muerte de insectos subsimbióticos expuestos a *B. bassiana*.

The background of the slide is a light gray color with a pattern of microscopic, oval-shaped fungal spores scattered across it. In the upper right quadrant, there is a single, larger, brownish insect with wings, likely a fly or a similar pest. A thin, orange line starts from the top right, loops around, and ends in an arrow pointing towards the text below.

## CAPÍTULO 2

Reducción del número de **YLS** de *Delphacodes kuscheli* mediante la aplicación de fungicidas sistémicos sobre plantas de avena

---



## 2.1 Introducción

La diversificación de las plantas terrestres dio como resultado la aparición de nuevos nichos ecológicos, posibilitando la radiación adaptativa de los insectos fitófagos (Farrell y Mitter, 1994). Este proceso fue favorecido por el aporte de nutrientes y otros beneficios que los simbioses mutualistas les brindaron a los insectos hospederos, por ejemplo, el debilitar o superar las defensas de las plantas mediante la detoxificación (Hansen y Moran, 2013; Sudakaran *et al.*, 2015). Estas asociaciones les permitieron a los insectos picadores succionadores aprovechar la savia del xilema y floema como fuente de alimento, ya que por sí sola, no lograría cubrir los requerimientos nutricionales de los mismos (Skidmore y Hansen, 2017; Hansen *et al.*, 2020).

Debido a la fuerte codependencia y a la íntima relación entre los endosimbiontes obligados y los Auchenorrhyncha que se alimentan de savia, estos microorganismos no se han podido cultivar *in vitro* hasta el momento (Wilson y Duncan, 2015; Wang *et al.*, 2020). Una posible explicación, es que sus genomas están altamente especializados para la vida dentro del insecto y a lo largo de la evolución fueron perdiendo muchos genes, entre ellos, los necesarios para la vida independiente (Fan *et al.*, 2015; Gil y Latorre, 2019). Por lo tanto, el estudio de estos microorganismos y sus funciones se basa en experimentos *in vivo* de reducción o eliminación de los endosimbiontes en los insectos, de manera de evidenciar la relevancia de los mismos para sus hospederos (Douglas, 2011; Ferrater *et al.*, 2013; Horgan y Ferrater, 2017; Li *et al.*, 2022). En forma conjunta, para validar la información obtenida y ampliar su estudio, se realizan análisis genómicos, metagenómicos y transcriptómicos de los endosimbiontes y se comparan las funciones putativas con las observadas en los insectos *in vivo* (Hou *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2015).

La transmisión vertical de los simbioses benéficos para el insecto hospedero es una característica común en las simbiosis obligadas. Dentro del grupo de insectos hemípteros heterópteros conocidos como “chinchas”, existen rutas extracelulares para transferir sus simbioses (Hosokawa y Fukatsu, 2020). Algunos ejemplos de estas estrategias incluyen la transmisión de cápsulas con simbioses a sus huevos, la presencia de secreciones gelatinosas que rodean a los huevos o la coprofagia por parte de las ninfas, donde consumen las excreciones de la madre que contienen los simbioses (Fukatsu y Hosokawa, 2002; Salem *et al.*, 2015). Estos métodos de transmisión, permiten la eliminación relativamente sencilla de los simbioses a través de la esterilización superficial de los huevos o del medio circundante, lo que facilita la investigación de los efectos observados en el hospedero por la falta de simbioses (Hosokawa *et al.*, 2012). En cambio, la eliminación de simbioses transferidos por transmisión transovarial, como es el caso de los endosimbioses fúngicos **YLS** de la familia Delphacidae (subfamilia Delphacinae), constituye un proceso de mayor complejidad.

En los ejemplares de delfácidos estudiados, no se ha logrado eliminar a los YLS en su totalidad, debido a la dependencia mutua con sus insectos hospederos (Noda y Saito, 1979; Zhang *et al.*, 2008; Pang *et al.*, 2020). Se ha demostrado que estos endosimbioses están presentes en todas las etapas de desarrollo de las chicharritas y que su número aumenta desde el estado de huevo hasta el estado adulto. Alcanzan una mayor abundancia en las hembras que en los machos, observándose un pico máximo en las hembras en la etapa reproductiva y cayendo bruscamente en los machos adultos (Noda, 1974; Ferrater *et al.*, 2013) condición que ha sido reportada también para *D. kuscheli* (Liljesthröm *et al.*, 2017). Por lo tanto, en los ensayos experimentales realizados para reducir el número de YLS, solo se han obtenido insectos **subsimbioses**, denominados de esta manera para diferenciarlos de los insectos que están libres del simbiote *target*, llamados aposimbioses.

Tradicionalmente se han utilizado dos metodologías con el objetivo de reducir a los endosimbiontes de chicharritas y otros taxones de insectos: tratamientos térmicos (Glaser, 1946; Hou y Lee, 1984; Wilkinson e Ishikawa, 2001; Zhang *et al.*, 2008; Horgan *et al.*, 2021) y tratamientos químicos (Chen *et al.*, 1981b). El tratamiento térmico que resultó más efectivo en los delfácidos estudiados, consiste en exponer durante tres días a ninfas I de 0-24 h de emergidas a una temperatura de 35 °C y luego reincorporarlas a las mismas condiciones de cría que el resto de la colonia. Esta combinación de tiempo y temperatura ha sido ampliamente utilizada y se ha convertido en un estándar/patrón en la reducción de YLS de las chicharritas asiáticas (Noda y Saito, 1979; Vega y Dowd, 2005; Ferrater *et al.*, 2013) y también ha mostrado ser relativamente eficaz en las pruebas realizadas sobre *D. kuscheli* (de la Fuente *et al.*, 2019). Sin embargo, resulta difícil en muchas ocasiones interpretar si los efectos resultantes sobre los insectos luego del tratamiento, son consecuencia del “*shock térmico*” *per se* o de la disminución de los YLS, debido a la influencia que tiene la temperatura sobre la biología de los insectos (Liu y Zhang, 2013; Wang *et al.*, 2013). Por este motivo, continúa la búsqueda de alternativas para la reducción de los YLS y una de las metodologías empleadas ha sido el tratamiento químico. Debido a que se encontraron antibióticos efectivos en eliminar a los endosimbiontes intracelulares bacterianos presentes en otros insectos como cucarachas, escarabajos y pulgones (Glaser, 1946; Baker y Lum, 1973; Griffiths y Beck, 1974), esta misma técnica fue abordada para reducir a los YLS fúngicos de chicharritas. Con este fin, se generaron dietas artificiales incluyendo distintos tipos de antibióticos o los mismos fueron aplicados sobre las plantas de las que los insectos se alimentaron, y si bien algunos tuvieron éxito en reducir el número de YLS (Chen *et al.*, 1981b; Zhao *et al.*, 2022), otros trabajos recientes mostraron efectos directos sobre la microbiota bacteriana de las chicharritas que no fueron el *target* de estos estudios (Shi *et al.*, 2021). Además, se ha demostrado la reducción de YLS con aceite de *neem*, un insecticida natural (Raguraman y Saxena, 1994).

Otro tipo de tratamiento químico desarrollado para la reducción de YLS, aunque poco explorado y de los más recientes dentro de los métodos de reducción de endosimbiontes en comparación a los tratamientos anteriores, es el uso de fungicidas (Shentu *et al.*, 2016, 2019; Pang *et al.*, 2020; de la Fuente, *et al.*, 2021).

Se conoce como fungicida a toda sustancia que se utiliza para matar o inhibir el desarrollo de los hongos. Según su capacidad de absorción y movimiento en la planta se clasifican en: (i) de contacto, sin movimiento en la planta, (ii) mesostémicos o también llamados translaminares, que ingresan al mesófilo de la hoja y (iii) **sistémicos**, que se translocan en la planta. Los productos sistémicos son absorbidos por las hojas y también por las raíces. Posteriormente, se transportan mayormente por xilema de manera acrópeta (hacia arriba de la planta), aunque también hay productos con movimiento por floema, y finalmente difunden a ambos tejidos vasculares. También pueden catalogarse según su sitio de acción, distinguiéndose principalmente aquellos que actúan en los hongos como inhibidores de la respiración, en la mitosis y división celular, en la síntesis de lípidos e integridad de la membrana, en la biosíntesis de esterol en la membrana y en la biosíntesis de la pared celular (Arregui y Puricelli, 2018).

**En este capítulo de tesis se aborda el primer objetivo propuesto:** desarrollar métodos efectivos y específicos para reducir el número de endosimbiontes mutualistas fúngicos (YLS) en *D. kuscheli*. Para lograrlo, se exploró la aplicación de fungicidas sistémicos sobre plantas de avena de las que se alimenta el insecto y se evaluó su respuesta (cuantificando el número de YLS) en distintos estados (ninfas y adultos) y estadios (ninfas III y IV) del desarrollo. A través de esta metodología, se buscó encontrar una forma práctica de manipular a los YLS en condiciones de laboratorio, para comprender la relación mutualista y las implicaciones de los mismos en la biología y ecología de *D. kuscheli*, temáticas que serán tratadas en los siguientes capítulos.

Hipótesis y predicciones asociadas:

- H: Los fungicidas sistémicos asperjados sobre las plantas de avena de las que *D. kuscheli* se alimenta, afectan a sus endosimbiontes fúngicos mutualistas obligados, los YLS. El efecto de estos fungicidas sobre el número de YLS, depende del tiempo de exposición y del estado de desarrollo en el que los insectos fueron expuestos a los mismos.
- P: El número de YLS será menor en insectos que se alimentan de plantas tratadas con fungicidas sistémicos, obteniéndose de esta manera insectos subsimbióticos. Asimismo, insectos expuestos mayor cantidad de tiempo a los fungicidas y desde menores estados de desarrollo, tendrán un menor número de YLS.

## **2.2 Materiales y métodos**

### 2.2.1 Cría de insectos y cultivo de plantas

Los ejemplares de *D. kuscheli* utilizados en los experimentos fueron obtenidos de una cría artificial mantenida en el bioterio de la División Entomología, FCNyM-UNLP. Los insectos fundadores de la colonia provinieron de colectas realizadas en campos de avena en Río Cuarto, Córdoba, y se criaron masivamente durante varias generaciones sobre este mismo hospedero. Las plantas de avena empleadas para mantener la colonia fueron obtenidas de la siembra periódica de semillas de la variedad Elizabeth, proporcionadas por la Estación Experimental Agropecuaria Bordenave (INTA, Buenos Aires, Argentina). Las semillas se sembraron en macetas plásticas con tierra fértil y, tanto hembras y machos como ninfas, se criaron sobre las plantas cuando estas se encontraban en estado vegetativo (tercera hoja expandida). Para asegurar una manipulación más sencilla de los insectos, las plantas se circunscribieron con un capuchón plástico de tereftalato de polietileno (PET) transparente, de 20 cm alto x 10

cm diámetro, cubierto por un trozo de tela de *voile* en el extremo superior a modo de jaula, permitiendo la visualización de los mismos. Los insectos fueron trasladados a nuevas plantas mediante un aspirador a medida que las plantas hospederas se deterioraban debido a la alimentación.

La cría se llevó a cabo bajo condiciones controladas de temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humedad relativa (40%-60%) y fotoperíodo (16 h luz: 8 h oscuridad) en dicho bioterio.

### 2.2.2 Pruebas preliminares

Para obtener insectos subsimbióticos (número de YLS reducido) se realizaron diferentes ensayos piloto modificando las condiciones de los mismos hasta lograr un ajuste del protocolo adecuado. Para esto, se probaron distintos fungicidas sistémicos comerciales, en concentraciones y dosis diferentes, se varió el número de plantas asperjadas por los fungicidas y el tamaño y características de las jaulas que sirvieron de contención para que los insectos se alimentaran de las plantas tratadas. A su vez, se probaron insectos en distintos estados y estadios de desarrollo. A continuación, se detallan los fungicidas y protocolos que fueron seleccionados para realizar los ensayos finales de la tesis.

### 2.2.3 Fungicidas utilizados

Se seleccionaron seis fungicidas sistémicos comerciales para realizar los ensayos finales, identificados a partir de aquí con las siguientes abreviaturas según sus principios activos: 48% p/v **protioconazol** (Brumby<sup>®</sup> 480 SC, Bayer CropScience) (**P**), 32,5% p/v **protioconazol** y **trifloxistrobin** (CRIPTON<sup>®</sup> SC, Bayer CropScience) (**PT**), 18,3% p/v **piraclostrobin** y **epoxiconazol** (Opera<sup>®</sup>, BASF) (**PE**), 18,1% p/v **piraclostrobin**, **epoxiconazol** y **fluxapiroxad** (Orquesta<sup>®</sup> Ultra, BASF) (**PEF**), 28% p/v **picoxistrobin** y **ciproconazol** (Stinger<sup>®</sup> SC, DuPont Agro) (**PC**) y 43% p/v **tebuconazol**

(Tebuconazol® SC, Nufarm) (**T**). Los fungicidas PT, PE, PEF y PC están indicados para ser aplicados en maíz, trigo y cebada (entre otros cultivos), P en maní y T en avena, cebada, centeno y trigo, según sus respectivos marbetes.

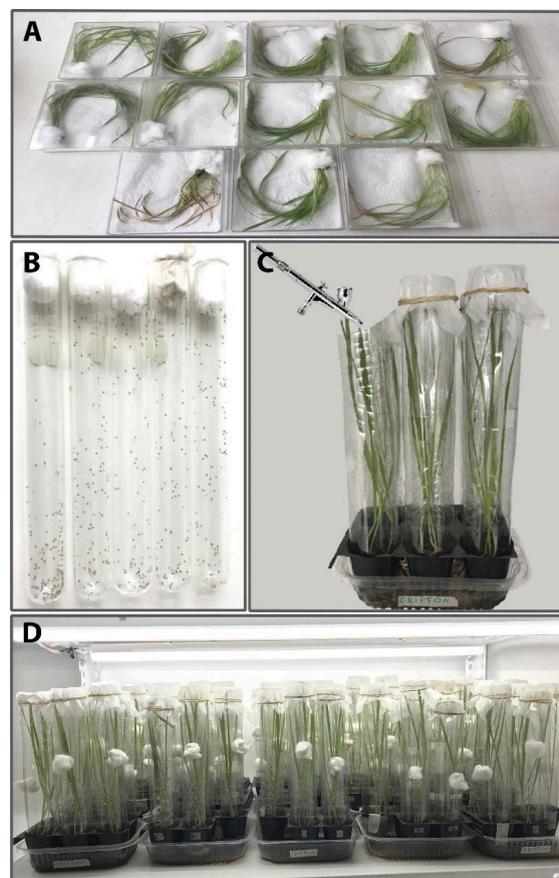
#### 2.2.4 Protocolo general de obtención de insectos y plantas experimentales

Para obtener las cohortes de insectos utilizados en los experimentos, se seleccionaron posturas de distintas hembras provenientes de la colonia. Las posturas de *D. kuscheli* son endofíticas y los huevos se reconocen a simple vista cuando están próximos a la eclosión (estado de ojos rojos). Se extrajeron las plantas con posturas y se mantuvieron en cajas plásticas (11 cm ancho × 15 cm largo × 2 cm alto) acondicionadas con algodón hidratado envolviendo las raíces y apoyadas sobre papel absorbente hasta la eclosión de los huevos. Las ninfas de 0 a 24 h de edad correspondientes a una misma cohorte se transfirieron a jaulas plásticas de PET transparentes (20 cm alto x 10 cm diámetro) con plantas de avena hasta su uso para ensayos.

Las plantas de avena sobre las que se asperjaron los fungicidas, se cultivaron a partir de semillas de la variedad Elizabeth. Las semillas se colocaron en bandejas plásticas de germinación conteniendo tierra fértil. Se dejaron entre dos y tres plantas por cubículo, retirando el resto de las semillas germinadas. En el estado de tres hojas, estas plantas se rociaron al azar y uniformemente con 500 µl de cada uno de los fungicidas diluidos en agua destilada estéril utilizando un aerógrafo profesional (modelo 180 con una boquilla de 0,25–0,3 mm de diámetro y una copa de 9 ml de capacidad). La concentración de los fungicidas aplicados fue de 0,1%, por ser la recomendada para los tratamientos a campo y por haber resultado la más efectiva en la reducción del número de YLS en los ensayos preliminares. Veinticuatro horas posteriores a la aspersion se colocaron los insectos (n=5) en distintos estados de desarrollo según el ensayo requerido: ninfas III (9 días de edad), ninfas IV (12 días de edad) o hembras de 0-24 h

sobre las plantas y dentro de sus respectivas jaulas plásticas, cilíndricas y transparentes (PET, 20 cm de alto × 4 cm de diámetro) cubiertas por un trozo de tela de *voile* en el extremo superior. Con el fin de promover la ingestión de la savia de plantas tratadas con los fungicidas, los insectos se privaron de alimento durante 2 h antes de ser liberados en las jaulas. Como control negativo se utilizaron plantas rociadas únicamente con agua destilada estéril siguiendo el mismo procedimiento para los insectos (**Fig. 2.1**). Estos experimentos se llevaron a cabo en el mismo bioterio y bajo las mismas condiciones en las que se mantuvo la colonia de insectos.

Los insectos destinados a la cuantificación de YLS fueron retirados mediante un aspirador a través de un orificio realizado en las jaulas, sexados diferenciando hembras de machos en el caso de los adultos, y fijados individualmente en etanol 70% para evitar que el número de YLS se modifique y así conservarlos hasta su análisis.



**Fig. 2.1. Protocolo para la obtención de insectos subsimbióticos y control. (A)** Plantas de avena provenientes de la colonia con posturas endofíticas. **(B)** Ninfas I emergidas al día siguiente. **(C)** Aspersión de las plantas con el fungicida a ensayar o agua destilada para el control. **(D)** Jaulas donde se colocaron los insectos 24 h posteriores a la aspersión.

A continuación se describen los ensayos realizados para conocer el efecto de los fungicidas sistémicos sobre el número de YLS en distintas etapas del desarrollo de *D. kuscheli* y seleccionar un protocolo óptimo de reducción de YLS.

#### 2.2.4.1 Reducción del número de YLS en ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con fungicidas, y extraídas al día 1, 3 y 5

Se evaluó si los fungicidas tienen un efecto en la reducción de YLS en ninfas durante los primeros días en que los insectos se alimentan de las plantas tratadas. El ensayo fue realizado en dos momentos diferentes en el tiempo atendiendo a la disponibilidad de los fungicidas. En una primera instancia, se contó con los fungicidas PC, PE y PEF y posteriormente, se emplearon P, PT, y T. En ambos casos se utilizó agua destilada como control (C). Luego, 24h posteriores a la aspersión de los tratamientos sobre plantas de avena en estado de tres hojas, se colocaron por jaula cinco ninfas III recolectadas aleatoriamente de la misma cohorte (n=50, 10 réplicas por tratamiento). Para cuantificar el número de YLS, se extrajeron aleatoriamente 10 de estas ninfas por tratamiento al día 1, 3 y 5 posteriores a la liberación de las mismas en sus respectivas jaulas (n=30).

Para el análisis con los fungicidas P, PT, T y el control, se ajustó un modelo lineal general de distribución normal. Para los fungicidas PC, PE, PEF y el control, se ajustó un modelo lineal generalizado con distribución gamma y función de enlace log. En ambos casos se modeló el número

promedio de YLS por insecto como variable respuesta y la interacción entre las variables explicativas categóricas “tratamiento” y “día de extracción”.

#### 2.2.4.2 Reducción del número de YLS en adultos de 0-24 h provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con fungicidas

Se realizó el mismo procedimiento anterior con los seis fungicidas en simultáneo y el control con agua destilada, pero, en este caso, permitiendo que las ninfas muden al estado adulto. Se recolectaron ninfas III en forma aleatoria de una misma cohorte y 24 h posteriores a la aplicación de cada tratamiento, fueron colocadas en grupos de cinco (n= 50 por cada fungicida y n= 75 control) dentro de cada jaula en las plantas de avena. A medida que las ninfas mudaron al estado adulto, estos fueron extraídos para la cuantificación de sus YLS.

Para el análisis, se ajustó un modelo lineal general con distribución normal y, dado que se detectó heterocedasticidad, se modeló una varianza para cada tratamiento. Se modeló el número promedio de YLS por insecto como variable respuesta y la interacción entre las variables explicativas categóricas “tratamiento” y “sexo de los adultos”.

#### 2.2.4.3 Reducción del número de YLS en adultos de 0-24 h provenientes de ninfas alimentadas desde el cuarto estadio sobre plantas tratadas con fungicidas

Este experimento tuvo la finalidad de conocer si el estadio de desarrollo en el que las ninfas fueron expuestas a los fungicidas, influye en el número de YLS de los adultos recién emergidos. Para esto, se recolectaron ninfas de cuarto estadio en forma aleatoria de una misma cohorte y, 24 h posteriores a la aplicación de cada tratamiento, fueron colocadas en grupos de cinco (n= 50 para cada fungicida y control) dentro

de las jaulas. A medida que las ninfas mudaron al estado adulto, estos fueron extraídos para la cuantificación de YLS.

Para el análisis se ajustó un modelo lineal generalizado con distribución gamma y función de enlace log. Se modeló el número promedio de YLS por insecto como variable respuesta y la interacción entre las variables explicativas categóricas “tratamiento” y “sexo de los adultos”.

#### 2.2.4.4 Reducción del número de YLS en hembras adultas alimentadas durante 5 días sobre plantas tratadas con fungicidas

Para conocer si el estado de desarrollo en el que los insectos fueron expuestos a las plantas tratadas con fungicidas, afecta el número de YLS, se utilizaron hembras adultas de 0-24 h de emergidas. La elección de las hembras se basó en que la abundancia de YLS aumenta a medida que se acercan a su etapa reproductiva, mientras que en los machos, los YLS disminuyen hasta casi perderse por completo. Aquí se evaluaron los fungicidas P, PT y PC, porque fueron los más efectivos en reducir el número de YLS en los ensayos previos, y agua destilada como control (C). Pasadas 24h desde la aplicación de los tratamientos, de la misma manera descrita previamente, se colocaron cinco hembras por jaula (n inicial: C= 30, PC= 30, P= 45, PT= 45), recolectadas aleatoriamente de la misma cohorte. Al quinto día, las hembras que sobrevivieron fueron retiradas de las plantas para la cuantificación de sus YLS (n final: C= 27, PC= 20, P=40, PT= 43) .

Para el análisis, se ajustó un modelo lineal general de distribución normal. Se modeló el número promedio de YLS por insecto como variable respuesta y el “tratamiento” como variable explicativa categórica.

#### 2.2.4.5 Reducción del número de YLS en adultos de 3 días provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con el fungicida PT

En esta instancia, se buscó conocer el efecto del fungicida PT sobre el número de YLS a los 3 días que los insectos muden al estado adulto, ya que en este momento se inicia el período reproductivo de *D. kuscheli*. El criterio de selección de este fungicida radicó en que fue el que produjo una mayor reducción de YLS y afectó significativamente los parámetros biológicos del insecto (resultados detallados en ensayos realizados en el capítulo 3).

Siguiendo el mismo protocolo, 24 h posteriores a la aplicación de dicho fungicida y de agua destilada como control, se colocaron cinco ninfas III por jaula recolectadas de forma aleatoria de una misma cohorte. Entre las 0-24 h de producida la muda al estado adulto, machos y hembras fueron extraídos y mantenidos en parejas individuales en tubos de ensayo de vidrio tapados en su extremo con un tapón de algodón y provistos de una hoja de avena fresca y libre de fungicidas, que fue reemplazada diariamente. Se conformaron un total de 56 parejas control y 44 parejas subsimbióticas. En el caso de no haber contado con machos de un mismo tratamiento, se incorporaron machos de la cría aunque posteriormente no fueron contemplados para la cuantificación del número de YLS. Al tercer día, fueron retirados para la cuantificación de sus YLS un total de 56 hembras y 36 machos pertenecientes al tratamiento control y 44 hembras y 35 machos pertenecientes al tratamiento con el fungicida PT.

Para el análisis, se ajustó un modelo lineal generalizado con distribución gamma y función de enlace log. Se modeló el número promedio de YLS por insecto como variable respuesta y la interacción entre las variables explicativas categóricas “tratamiento” y “sexo de los adultos”.

#### 2.2.4.6 Reducción del número de YLS en adultos de 7 días provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con el fungicida PT

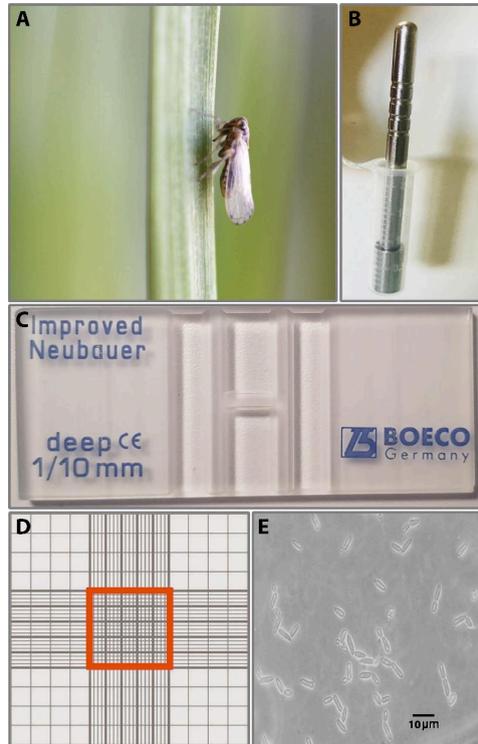
Por último, se cuantificó el número de YLS a los 7 días de producida la muda al estado adulto. Los 7 días corresponden al período durante el cual se evaluó la virulencia de *B. bassiana* sobre *D. kuscheli* (experimento detallado en el capítulo 5). De la misma manera, 24h posteriores a la aplicación de los tratamientos con dicho fungicida y agua destilada como control, se colocaron cinco ninfas III por jaula recolectadas de forma aleatoria provenientes de una misma cohorte. Entre las 0-24h de producida la muda al estado adulto, machos y hembras fueron extraídos y mantenidos sobre plantas de avena sin ningún tratamiento y en grupo, simulando las condiciones del ensayo que posteriormente se llevaría a cabo con *B. bassiana* (Capítulo 5). A los siete días, los insectos adultos se extrajeron para la cuantificación de YLS contando con un total de 19 hembras y 11 machos para el control y 16 hembras y 14 machos del tratamiento con el fungicida PT.

Para el análisis se ajustó un modelo lineal general de distribución normal y, dado que se detectó heterocedasticidad, se modeló una varianza para cada tratamiento. Se modeló el número promedio de YLS por insecto como variable respuesta y la interacción de las variables explicativas categóricas “tratamiento” y “sexo de los adultos”.

### 2.2.5 Cuantificación de YLS

Los insectos de los diferentes experimentos se machacaron individualmente con un micropistilo de acero en un tubo Eppendorf (2,5 ml de capacidad). Al machacado se le agregaron 0,5 ml de agua destilada estéril continuando con el procesamiento hasta eliminar las partes sólidas. Luego, con el uso de una micropipeta, se extrajeron dos gotas de 50  $\mu$ l que se colocaron cada una sobre las grillas inferior y superior de un hemocitómetro (Cámara de Neubauer, BOECO Alemania). Se cuantificó el número de YLS en los 25 cuadrados centrales de las grillas superior e inferior y se promediaron los valores obtenidos. Para estimar el número de

YLS por insecto, se multiplicó ese promedio por 5000, protocolo descrito por Liljesthröm *et al.* (2017) (**Fig. 2.2**).



**Fig 2.2. Cuantificación de YLS. (A)** Ejemplar de *D. kuscheli* a cuantificar (Foto: Andrea Toledo). **(B)** Micropistilo de acero utilizado para el machacado. **(C)** Hemocitómetro. **(D)** Campo de conteo utilizado. **(E)** Endosimbiontes levaduriformes.

### 2.2.6 Análisis de datos

Se llevaron a cabo comparaciones de medias para evaluar la existencia de diferencias en el número de YLS entre los insectos tratados con los distintos fungicidas y los insectos control. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* estadístico R versión 4.2.1 (R Core Team, 2022). Los modelos fueron realizados utilizando la función `glmmTMB` del paquete `glmmTMB` (Brooks *et al.*, 2017). Para probar los supuestos de los modelos, se utilizó el paquete `DHARMA` (Hartig, 2022). El criterio aplicado para la selección de modelos fue AIC (criterio de

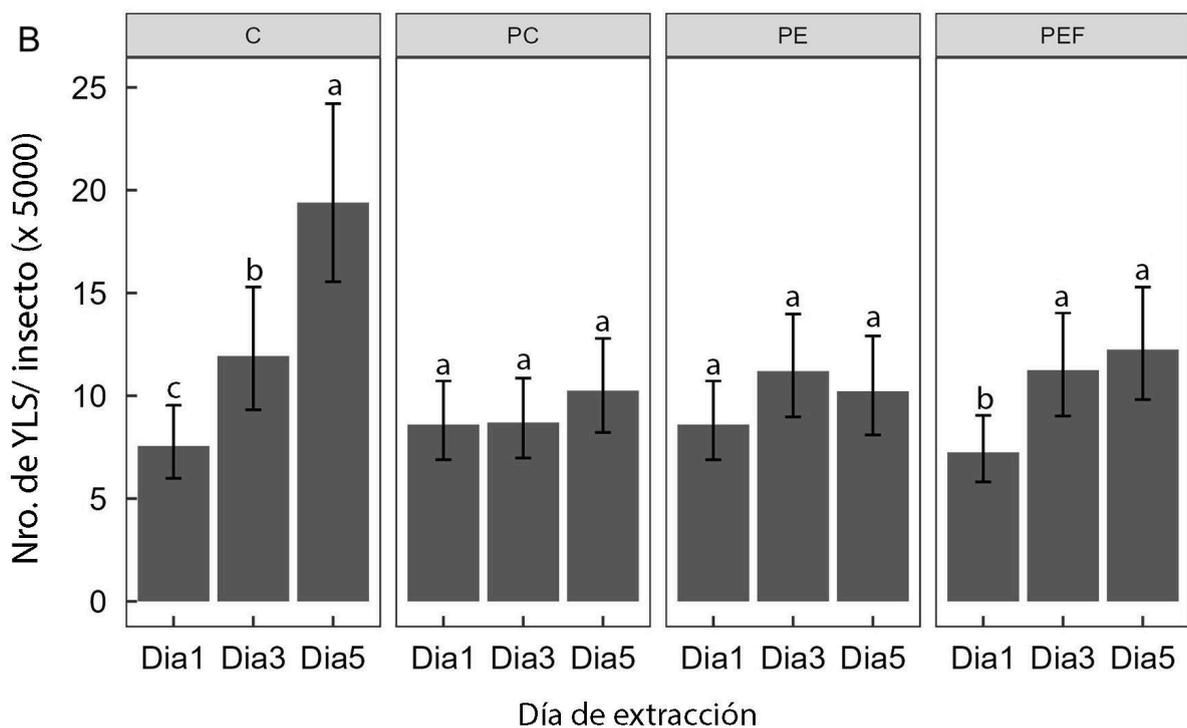
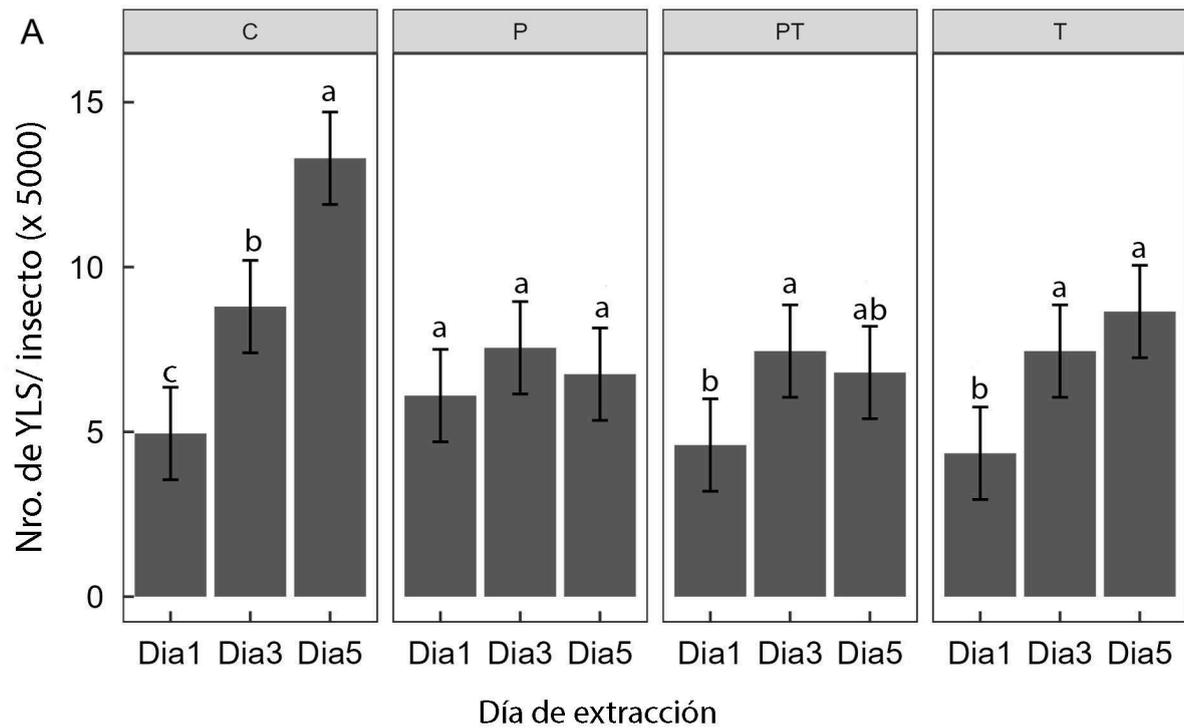
información de Akaike). Las pruebas de hipótesis sobre los coeficientes del modelo se calcularon mediante el test de Chi-cuadrado de Wald usando el paquete car (Fox y Weisberg, 2019). El nivel de significancia empleado fue 0,05 y se consideraron significativas aquellas pruebas con  $P < 0,05$ . Los contrastes de Tukey y los intervalos de confianza (IC) del 95% se obtuvieron con el paquete emmeans (Lenth *et al.*, 2020). Los gráficos se realizaron utilizando la biblioteca ggplot2 (Wickham *et al.*, 2020).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Reducción del número de YLS en ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con fungicidas, y extraídas al día 1, 3 y 5

Este ensayo mostró cómo se modificó el número de YLS en ninfas III que se alimentaron de plantas tratadas con los fungicidas y agua destilada en el transcurso de cinco días, particularmente al primer, tercer y quinto día de exposición. El análisis de los resultados reveló una interacción significativa entre las variables explicativas (Tratamientos P, PT, T y C  $\chi^2= 36,43$ ;  $gl= 6$ ;  $P<0,001$  y tratamientos PC, PE, PEF y C  $\chi^2= 17,67$ ;  $gl= 6$ ;  $P<0,001$ ), lo que indica que el efecto del día de extracción sobre el número de YLS cambia según el tratamiento aplicado.

Como se observa en la **figura 2.3**, mientras que el número de YLS de las ninfas control aumenta significativamente desde el primer al quinto día, no se observa un aumento significativo en las ninfas tratadas con los fungicidas P, PC y PE durante este período de observación. En el caso del fungicida PT, si bien hay un aumento del número de YLS al tercer día con respecto al primero, al quinto día se observa un efecto reductor del fungicida sobre el número de YLS y no se logran establecer diferencias con respecto al primer y tercer día. Los fungicidas T y PEF, solo muestran un aumento significativo del número de YLS al tercer día, que se estabiliza al quinto día.

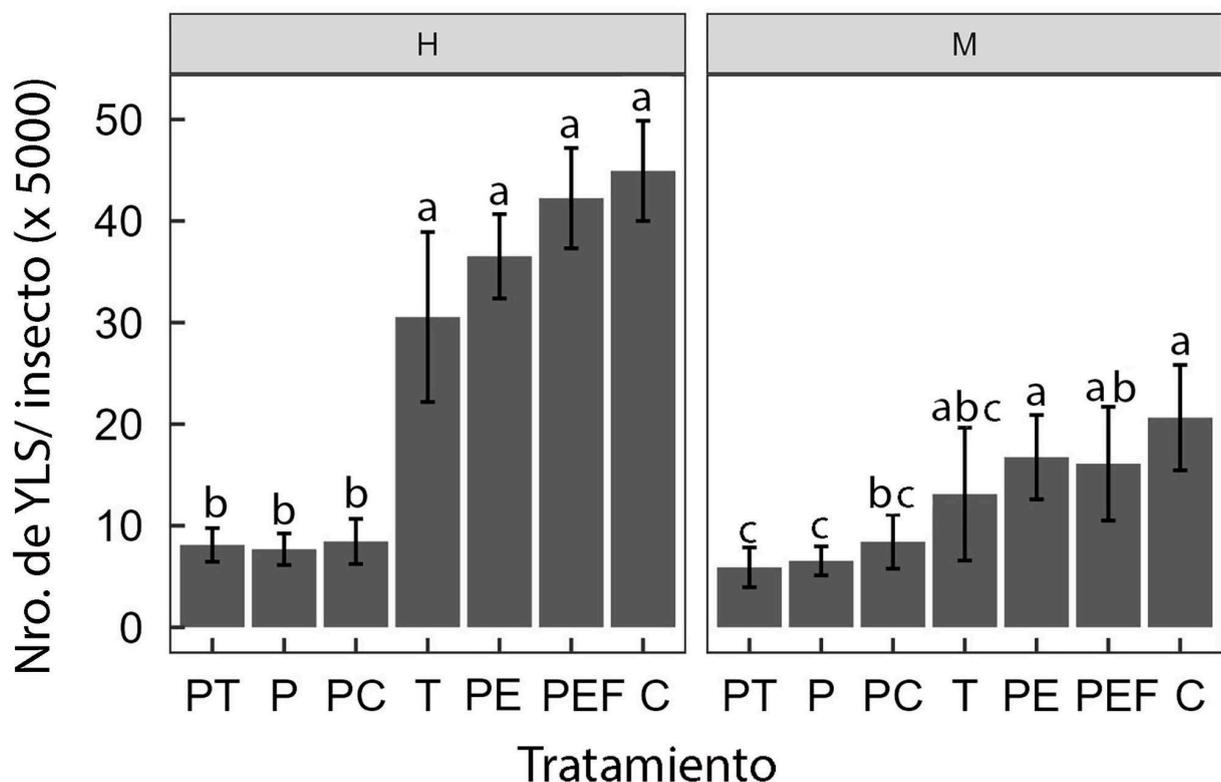


**Fig. 2.3. A y B Número de YLS por insecto cuantificado al primer, tercer y quinto día de que ninfas de tercer estadio se alimentaran sobre plantas de avena tratadas con agua destilada y fungicidas.** Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los días de extracción según cada tratamiento. **C=**

control, **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **T**= tebuconazol, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad.

### 2.3.2 Reducción del número de YLS en adultos de 0-24 h provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con fungicidas

En este ensayo se exploró la dinámica en el número de YLS una vez que las ninfas III, alimentadas sobre plantas tratadas con fungicidas y agua destilada, mudaron al estado adulto. Los resultados mostraron una interacción significativa entre las variables explicativas ( $\chi^2=113,81$ ;  $gl=6$ ;  $P<0,001$ ), lo que indica que el efecto de los tratamientos sobre el número de YLS en adultos depende del sexo. Sin embargo, los fungicidas P, PT y PC mostraron una reducción significativa del número de YLS tanto en hembras como en machos (**Fig. 2.4**).



**Fig. 2.4. Número de YLS** por insecto correspondiente a hembras y machos adultos de 0-24 h obtenidos a partir de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con agua destilada y fungicidas. Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los tratamientos dentro del mismo sexo. Total de hembras y machos analizados por tratamiento, respectivamente: **C** (n=31, 28), **P** (n=11, 13), **PT** (n=14, 10), **PC** (n=10, 7), **PE** (n=16, 16), **PEF** (n=18, 14), **T** (n=11, 18). **C**= control, **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **T**= tebuconazol, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad.

A su vez, las hembras mostraron mayores porcentajes de reducción del número de YLS que los machos cuando fueron tratadas con los fungicidas P, PT y PC (**Tabla 2.1**).

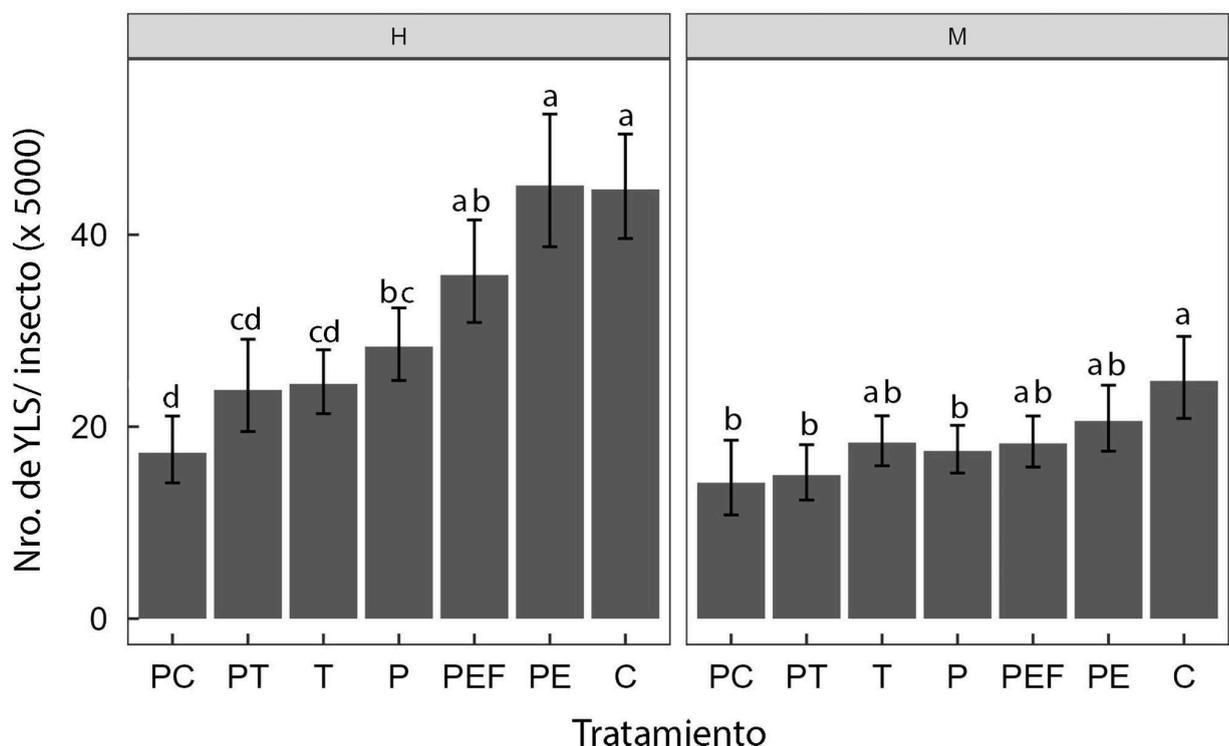
**Tabla 2.1.** Media del número de YLS (x5000), % de reducción de los YLS con respecto al control y número de insectos analizados (adultos provenientes de ninfas tratadas desde el tercer estadio). Se considera el número de YLS de los controles de hembras y machos como el 100%. **C**= control, **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad y **T**= tebuconazol.

Tratamiento	Hembras			Machos		
	Medias	% reducción	n	Medias	% reducción	n
<b>C</b>	44,94	-	31	20,64	-	28
<b>P</b>	7,68	82,91%	11	6,54	68,31%	13
<b>PT</b>	8,11	81,95%	14	5,90	71,41%	10
<b>PC</b>	8,45	80,08%	10	8,43	59,16%	7
<b>PE</b>	36,53	18,71%	16	16,75	18,85%	16
<b>PEF</b>	42,25	5,99%	18	16,11	21,95%	14
<b>T</b>	30,55	32,02%	11	13,11	36,48%	18

### 2.3.3 Reducción del número de YLS en adultos de 0-24 h provenientes de ninfas alimentadas desde el cuarto estadio sobre plantas tratadas con fungicidas

En este caso, se propuso conocer el impacto sobre el número de YLS de adultos cuando los insectos fueron tratados desde ninfa IV, un estadio más avanzado de desarrollo que en el ensayo anterior. Nuevamente, se observó una interacción significativa entre las variables explicativas ( $\chi^2=16,97$ ;  $gl=6$   $P<0,001$ ), mostrando que el efecto del tratamiento sobre el número de YLS en adultos depende del sexo.

Los fungicidas P, PT y PC redujeron significativamente el número de YLS con respecto al control tanto en hembras como en machos. El fungicida T redujo significativamente el número de YLS solo en las hembras (**Fig. 2.5**).



**Fig. 2.5. Número de YLS** por insecto correspondiente a hembras y machos adultos de 0-24 h obtenidos a partir de ninfas alimentadas desde el cuarto

estadio sobre plantas tratadas con agua destilada y fungicidas. Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los tratamientos dentro del mismo sexo. Total de hembras y machos analizados por tratamiento respectivamente: **C** (n=30, 15), **P** (n=25, 22), **PT** (n=11, 12), **PC** (n=11, 6), **PE** (n=19, 17), **PEF** (n=21, 21), **T** (n=24, 22). **C**= control, **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **T**= tebuconazol, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad.

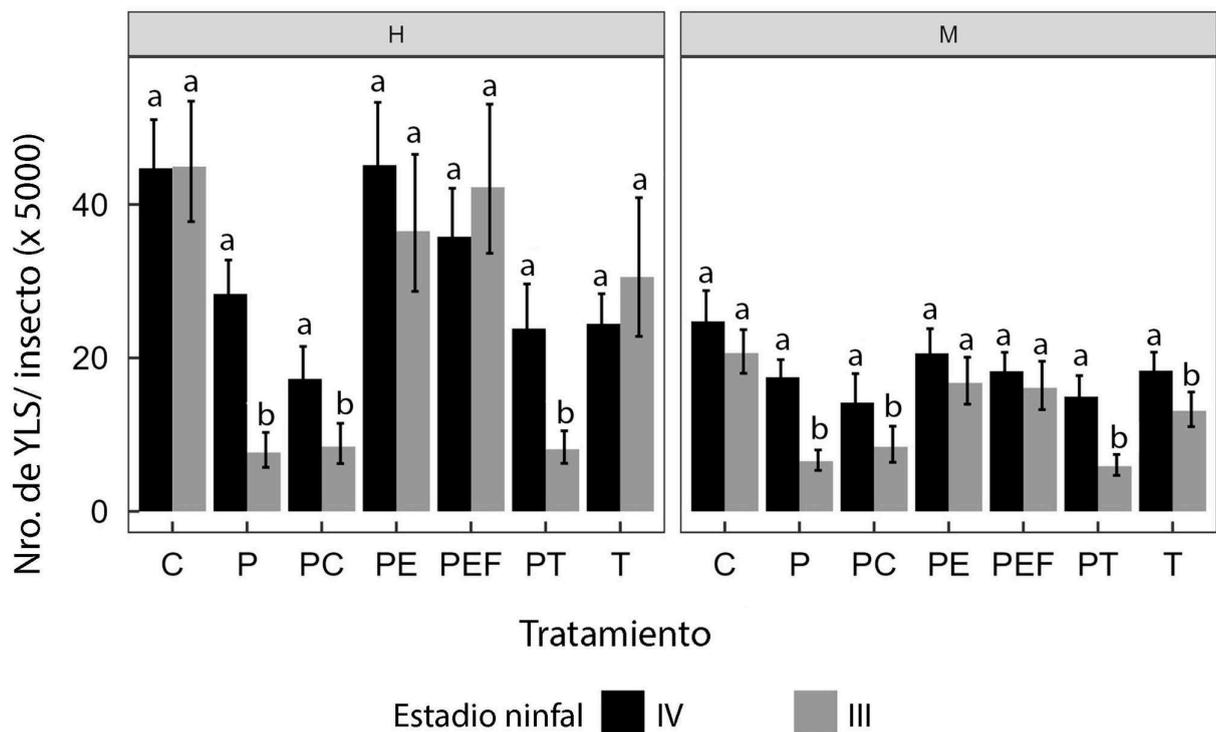
Asimismo, las hembras mostraron mayores porcentajes de reducción del número de YLS que los machos cuando fueron tratadas con los fungicidas P, PT y PC (**Tabla 2.2**).

**Tabla 2.2.** Media del número de YLS (x5000), % de reducción de los YLS con respecto al control y número de insectos analizados (adultos provenientes de ninfas tratadas desde el cuarto estadio). Se considera el número de YLS de los controles de hembras y machos como el 100%. **C**= control, **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad y **T**= tebuconazol.

Tratamiento	Hembras			Machos		
	Medias	% reducción	n	Medias	% reducción	n
<b>C</b>	44,72	-	30	24,76	-	15
<b>P</b>	28,34	36,63%	25	17,48	29,40%	22
<b>PT</b>	23,82	46,73%	11	14,96	39,58%	12
<b>PC</b>	17,27	61,38%	11	14,16	42,81%	6
<b>PE</b>	45,13	0%	19	20,43	17,49%	17
<b>PEF</b>	35,80	19,94%	21	18,26	26,25%	21
<b>T</b>	24,45	45,32%	24	18,34	25,93%	22

Comparando el número de YLS de los adultos obtenidos cuando fueron expuestos a los tratamientos desde ninfas III vs. ninfas IV, se observó

que el número de YLS dependió del estadio ninfal de desarrollo bajo ciertos tratamientos ( $\chi^2=70,34$ ;  $gl=6$ ;  $P<0,001$ ). Los adultos alimentados desde ninfas III con los fungicidas, P, PC y PT tuvieron un menor número de YLS que los alimentados con los mismos fungicidas desde ninfa IV, mientras que no se observaron diferencias bajo los restantes tratamientos (Fig. 2.6).



**Fig. 2.6. Número de YLS** por insecto correspondiente a hembras y machos adultos de 0-24 h obtenidos a partir de ninfas alimentadas desde el tercer estadio VS. el cuarto estadio, sobre plantas tratadas con agua destilada y fungicidas. Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre un mismo tratamiento según el estadio ninfal, para cada sexo. **C**= control, **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **T**= tebuconazol, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad.

#### 2.3.4 Reducción del número de YLS en hembras adultas alimentadas durante 5 días sobre plantas tratadas con fungicidas

Con el propósito de obtener adultos subsimbióticos en menor tiempo, se expusieron hembras de 0-24 h sobre plantas de avena tratadas con los fungicidas PT, P y PC, que fueron los que anteriormente se destacaron por reducir el número de YLS en los adultos tratados desde ninfas. Sin embargo, en ninguno de dichos tratamientos con fungicida se observaron diferencias significativas en el número de YLS respecto al control ( $\chi^2= 5,04$ ;  $gl=3$ ;  $P=0,17$ ).

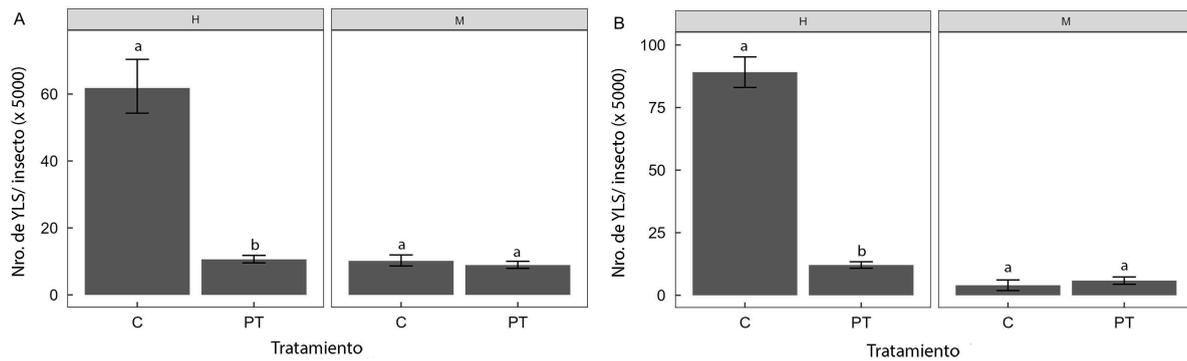
#### 2.3.5 Reducción del número de YLS en adultos de 3 días provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con el fungicida PT

En adultos de 3 días de edad, provenientes de ninfas tratadas desde el tercer estadio, la interacción fue significativa entre las variables explicativas ( $\chi^2=150,05$ ;  $gl=1$ ;  $P<0,001$ ), lo que indica que el efecto del fungicida PT sobre el número de YLS depende del sexo. Solo en las hembras, se redujo significativamente el número de YLS bajo el tratamiento PT con respecto al control, en promedio un 82,83 %, mientras que no se observaron diferencias en los machos bajo ambos tratamientos (**Fig. 2.7A**).

#### 2.3.6 Reducción del número de YLS en adultos de 7 días provenientes de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con el fungicida PT

En este ensayo se observó la misma tendencia que en el caso anterior, con la diferencia que al haber transcurrido cuatro días más, el número de YLS de las hembras fue aún mayor y el de los machos menor.

Nuevamente, la interacción fue significativa entre las variables explicativas ( $\chi^2=550,67$ ;  $gl= 1$ ;  $P<0,001$ ), mostrando que el efecto del fungicida depende del sexo. En hembras, se redujo significativamente el número de YLS bajo el tratamiento PT con respecto al control, en promedio un 86,43 %, mientras que no hubo diferencias significativas en los machos bajo ambos tratamientos. (**Fig. 2.7B**).



**Fig 2.7.** Número de YLS por insecto correspondiente a hembras y machos adultos de **(A)** 3 días y **(B)** 7 días de emergidos obtenidos a partir de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con agua destilada (**C**= control) y el fungicida **PT** (protioconazol y trifloxistrobin). Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los tratamientos dentro de un mismo sexo. Total de hembras y machos analizados por tratamiento, respectivamente **(A): C** (n=56, 36), **PT** (n=44, 35) **(B): C** (n=19, 11), **PT** (n=16, 14).

## 2.4 Discusión

La estrecha relación entre los insectos que se alimentan de dietas nutricionalmente deficientes y sus endosimbiontes obligados, hace de estos sistemas un interesante objeto de estudio. Por un lado, es relevante proporcionar conocimientos básicos sobre la ecología y coevolución de las interacciones simbióticas y por otro, es importante para establecer las bases de una nueva alternativa en el control de plagas conocida como "**control simbiótico**" (Chaves *et al.*, 2009; Crotti *et al.*, 2012; Gonella *et al.*,

2020). Esta estrategia se basa en la interrupción de las simbiosis mutualistas entre los microorganismos y sus hospederos.

Las interacciones mutualistas obligadas entre delfácidos y sus principales endosimbiontes son de especial interés. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de otros insectos donde las bacterias desempeñan un papel crucial, en este caso, los endosimbiontes son de naturaleza fúngica (YLS). Esta particularidad, junto al hecho de que los YLS se transmiten verticalmente a través de transmisión transovarial, hace relevante la búsqueda de técnicas innovadoras para reducir su número y facilitar así el estudio de las interacciones entre los endosimbiontes y sus hospederos. Con este fin, se probaron fungicidas sistémicos aplicados sobre plantas de avena de las que se alimentaron los insectos y se evaluó la efectividad de los mismos para reducir el número de YLS en distintos tiempos, en dos estadios ninfales de desarrollo, en hembras adultas y al primer, tercer y séptimo día que los insectos mudaron al estado adulto.

Los resultados mostraron que cuando las ninfas de tercer estadio fueron expuestas a los fungicidas por un período de cinco días, todos ellos ejercieron un efecto inhibitorio sobre los YLS, ya que en ninguno de estos tratamientos se diferenció el número de YLS entre el tercer y quinto día de exposición. En cambio, en los controles se observó un incremento progresivo de los YLS desde el primer al quinto día de exposición.

Por otro lado, cuando se cuantificó el número de YLS en adultos recién mudados, provenientes de las ninfas expuestas a los fungicidas desde el tercer estadio, se pudo apreciar que las hembras tuvieron más YLS que los machos y que los fungicidas más efectivos en mantener la reducción del número de endosimbiontes en los adultos fueron P, PT y PC. Esto sugiere que, con los fungicidas restantes, los YLS fueron sensibles al menos en los primeros cinco días de exposición como ninfas, pero se recuperaron con el transcurso del tiempo hasta llegar al estado adulto con un número similar al de los insectos control.

Asimismo, se observó que si bien los fungicidas P, PT y PC resultaron efectivos en reducir la abundancia de YLS en adultos recién mudados cuando los insectos estuvieron expuestos en el cuarto estadio ninfal, la reducción fue significativamente mayor cuando estuvieron expuestos desde el tercer estadio ninfal. Esto puede deberse a que la abundancia de YLS es menor en insectos menos desarrollados y además, al hecho de que al comenzar el ensayo desde el tercer estadio ninfal, permanecieron mayor cantidad de días alimentándose sobre las plantas tratadas con dichos fungicidas en comparación a las ninfas que comenzaron a partir del cuarto estadio.

A su vez, cuando hembras adultas de 0-24 h fueron expuestas a estos mismos fungicidas P, PT y PC, que resultaron ser los más efectivos en reducir el número de YLS en los casos anteriores, no se observaron diferencias con respecto al control. En conjunto, la información obtenida en los ensayos anteriores refuerza la idea de que la abundancia inicial de YLS de los insectos, parece ser un factor determinante en la capacidad de reducción de endosimbiontes fúngicos por parte de los fungicidas en estudio, por lo tanto para obtener adultos subsimbióticos, el tercer estadio ninfal parece ser el más adecuado para empezar el tratamiento de reducción.

Finalmente, al utilizar el fungicida PT (seleccionado como uno de los más efectivos) y cuantificar el número de YLS en adultos de tres y siete días de mudados, provenientes de ninfas expuestas al fungicida desde el tercer estadio, se observó un aumento en el número de YLS en hembras adultas control, pero no así en las que fueron tratadas con el fungicida PT. Esto pone en evidencia que al menos hasta el séptimo día de las hembras adultas, el número de YLS permanece muy inferior al control. En machos, como muestra el modelo de abundancia de YLS en *D. kuscheli* (Liljeström *et al.*, 2017), el número de YLS decrece una vez que mudan al estado adulto, lo cual podría explicar por qué no se detectaron diferencias entre

los machos tratados con el fungicida PT y controles, ya que en ambos casos la abundancia de YLS fue muy baja.

Si bien en los últimos años se han realizado trabajos en delfácidos plaga en Asia que informan la posibilidad de reducir el número de YLS de estas chicharritas aplicando fungicidas sobre plantas de arroz (Shentu *et al.*, 2016, 2019; Pang *et al.*, 2020), no existen muchos registros referentes a esta práctica aplicada a otros insectos alimentadores del floema que forman asociaciones obligadas con endosimbiontes fúngicos (Vera-Ponce de León *et al.*, 2016). Cabe destacar en este punto, que los estudios realizados en esta tesis constituyen los primeros en efectuarse en delfácidos de distribución neotropical, como *D. kuscheli*.

Aquí se presentan tres nuevos fungicidas que no han sido reportados anteriormente como medio para la obtención de insectos subsimbióticos y que resultaron altamente efectivos cuando los mismos fueron expuestos desde el tercer estadio ninfal, mostrando los mayores porcentajes de reducción de YLS en adultos en comparación a otros fungicidas probados (Shentu *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2020) y a la técnica de reducción mediante “*shock térmico*” tradicionalmente utilizada en este tipo de estudios (Noda y Saito, 1979). Dado que los YLS se transmiten verticalmente y son desconocidos fuera de sus insectos hospederos por el hecho de haber perdido la capacidad de vida libre (Fan *et al.*, 2015), los insectos tratados con fungicidas no pueden recuperar la asociación con sus YLS por transferencia horizontal o por el medio ambiente. Por lo tanto, la dependencia obligada de estos insectos alimentadores del floema con sus endosimbiontes fúngicos los convierte en modelos ideales para explorar las estrategias de “control simbiótico” en estas plagas. Es por ello que numerosos estudios han examinado la importancia de los microorganismos asociados para el desempeño del hospedero en un esfuerzo por manipular estas asociaciones y hacer que las plagas de insectos sean más vulnerables (Berasategui *et al.*, 2016; Arora y Douglas, 2017; Sinno *et al.*, 2020). Comprender la dinámica y la función de las

interacciones simbióticas se convierte en un imperativo para revelar los mecanismos biológicos que sustentan la supervivencia, el desarrollo y la reproducción de estos insectos. Por ello, en el siguiente capítulo, se abordará el efecto de la reducción de los YLS sobre distintos parámetros biológicos de *D. kuscheli*.

## 2. 5 Anexo

**Tabla 1.** Reducción del número de YLS en ninfas de *D. kuscheli* alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con fungicidas, y extraídas al día 1, 3 y 5. Media del número de YLS (x 5000) para cada tratamiento según el día de extracción 1, 3 y 5 (que equivale a la cantidad de días que los insectos estuvieron alimentándose sobre las plantas tratadas). No se encontraron diferencias significativas en el número de YLS entre los tratamientos ni en el primer día ni en el tercero, pero sí al quinto, siendo mayor el número de YLS en los controles. **A: T=** tebuconazol, **PT=** protioconazol y trifloxistrobin, **C=** control, **P=** protioconazol. **B: PEF=** piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad, **C=** control, **PC=** picoxistrobin y ciproconazol y **PE=** piraclostrobin y epoxiconazol.

A

Tratamiento	Día de extracción	Media	IC 95%	Grupo
T	Día 1	4,35	2,95 - 5,75	a
PT	Día 1	4,60	3,20 - 6,00	a
C	Día 1	4,95	3,55 - 6,35	a
P	Día 1	6,10	4,70 - 7,50	a
T	Día 3	7,45	6,05 - 8,85	a
PT	Día 3	7,45	6,05 - 8,85	a
P	Día 3	7,55	6,15 - 8,95	a
C	Día 3	8,80	7,40 - 10,20	a
P	Día 5	6,75	5,35 - 8,15	b
PT	Día 5	6,80	5,40 - 8,20	b
T	Día 5	8,65	7,25 - 10,05	b
C	Día 5	13,30	11,90 - 14,70	a

## B

Tratamiento	Día de extracción	Media	IC 95%	Grupo
PEF	Día 1	7,25	5,81 - 9,05	a
C	Día 1	7,56	5,98- 9,54	a
PC	Día 1	8,60	6,90 - 10,73	a
PE	Día 1	8,60	6,90 - 10,73	a
PC	Día 3	8,70	6,97 - 10,86	a
PE	Día 3	11,20	8,98 - 13,98	a
PEF	Día 3	11,25	9,02 - 14,04	a
C	Día 3	11,94	9,32 - 15,29	a
PE	Día 5	10,22	8,10 - 12,91	b
PC	Día 5	10,25	8,22 - 12,79	b
PEF	Día 5	12,25	9,82 - 15,29	b
C	Día 5	19,40	15,57 - 24,21	a

# CAPÍTULO 3

Efecto de la reducción del número de  
**YLS** sobre parámetros biológicos  
de *Delphacodes kuscheli*



### 3.1 Introducción

Las asociaciones mutualistas entre insectos y simbiosntes jugaron un papel fundamental en el éxito evolutivo de los insectos, posiblemente por permitirles el acceso a nuevos nichos ecológicos (Janson *et al.*, 2008). Buchner (1965) notó que los insectos que prosperan con dietas nutricionalmente deficientes o desequilibradas como pueden ser la savia de las plantas o la sangre, suelen estar asociados con microorganismos endosimbiontes (en su mayoría bacterias) y postuló que éstos podrían desempeñar un papel relevante al proporcionar nutrientes complementarios a la dieta de dichos insectos. Los endosimbiontes a cambio, se mantienen en un ambiente estable y obtienen un suministro permanente de varios metabolitos producidos por los insectos hospederos (Chaves *et al.*, 2009). Un caso significativo es el de las chicharritas de la familia Delphacidae (subfamilia Delphacinae), cuyos simbiosntes obligados mutualistas son los “*yeast-like symbionts*” o **YLS** (Noda, 1974; Cheng *et al.*, 2024).

Como se mencionó anteriormente, los YLS se alojan en el cuerpo graso de ninfas y adultos y se transfieren a la descendencia por vía materna, migrando a través del hemocele hacia los ovocitos. Una vez que el óvulo se encuentra maduro, se agregan en el extremo posterior formando lo que se conoce como “*symbiont ball*” (Cheng y Hou, 2001; Nan *et al.*, 2016). Como los YLS aún no se han logrado cultivar *in vitro*, la secuenciación del genoma de estos endosimbiontes junto a la de uno de sus hospederos, *Nilaparvata lugens*, ha proporcionado una valiosa herramienta para conocer su rol en la asociación (Fan *et al.*, 2015). Estos estudios revelaron que los YLS tienen funciones complementarias con su insecto hospedero en al menos tres aspectos: **síntesis de aminoácidos esenciales, síntesis de esteroides y reciclaje de nitrógeno** (conversión de productos de desecho nitrogenados del insecto como el ácido úrico en compuestos de valor nutricional) (Xue *et al.*, 2014), por lo que se los incluye dentro de la

categoría de **endosimbiontes nutricionales** (Douglas, 2009; Kanyile *et al.*, 2022). Otra manera de explorar los posibles beneficios que los YLS aportan a sus hospederos y comprobar las funciones putativas que se les asignaron mediante técnicas moleculares, es a través de la experimentación *in vivo*, reduciendo su número y evaluando los efectos a través de los fenotipos resultantes (Noda, 1979; Shentu *et al.*, 2019). Tradicionalmente, la técnica utilizada para reducir el número de YLS en chicharritas es el “*shock térmico*” (Vega y Dowd, 2005; Ferrater *et al.*, 2013), aunque la misma presenta sus limitaciones debido a que los insectos son sensibles a la temperatura y es difícil distinguir si los efectos observados se deben a la reducción de los endosimbiontes o al tratamiento *per se* (Liu y Zhang, 2013; Wang *et al.*, 2013). Por esta razón, una técnica novedosa para avanzar en estos estudios es el uso de fungicidas, que busca minimizar el impacto en los insectos por tener como blanco a los endosimbiontes fúngicos.

Dentro de Delphacidae se encuentran reconocidas plagas agrícolas, tanto por el daño directo que ocasionan en los cultivos a través de la alimentación y oviposición como por ser vectores de fitopatógenos (Cook y Denno, 1994). Entre ellas, en la región neotropical se destaca *D. kuscheli*, vector del MRCV que se alimenta del floema de diversas gramíneas (Brentassi y Remes Lenicov, 2007). Posee una metamorfosis hemimetábola, es decir que durante su ciclo de vida pasa por los estados de huevo, ninfa y adulto. Sus posturas son endofíticas (depositadas dentro del tejido vegetal) y las ninfas que emergen atraviesan cinco estadios antes de mudar al estado adulto (Brentassi y Remes Lenicov, 1999; Remes Lenicov *et al.*, 2008). Tanto ninfas como adultos se desarrollan sobre las mismas plantas hospederas donde fueron depositados los huevos. Las poblaciones naturales de *D. kuscheli* muestran dimorfismo alar. Los adultos tienen dos formas morfológicamente distintas: individuos macrópteros con alas largas e individuos braquípteros con alas cortas. Ambas formas se presentan tanto en machos como en hembras, aunque las formas braquípteras son las menos comunes y más aún en los machos

(Boito y Ornaghi, 2008). Los macrópteros son capaces de volar largas distancias en búsqueda de nuevos recursos alimenticios o zonas más favorables. Los braquípteros poseen una capacidad de dispersión limitada y han sido encontrados en altos porcentajes sobre avena asociados al momento de mayor expansión de la población (Remes Lenicov *et al.*, 1991).

Con el fin de conocer diferentes características de la biología de *D. kuscheli* relacionadas a sus asociaciones mutualistas, estudios previos se han enfocado en demostrar el efecto que el estrés inducido por el calor tiene sobre el “fitness” de *D. kuscheli* y sobre el número YLS (de la Fuente *et al.*, 2019), así como también el efecto que posee la calidad nutricional de distintas zonas de la planta de avena sobre estos endosimbiontes obligados (Brentassi *et al.*, 2017). Aunque estas investigaciones explicaron facetas importantes del sistema *D. kuscheli*-YLS, muchos otros aspectos de la interacción entre el insecto y sus endosimbiontes aún se desconocen.

**En este capítulo de tesis se aborda el segundo objetivo propuesto:** evaluar el efecto de la reducción del número de YLS sobre distintos parámetros biológicos de *D. kuscheli*. Para lograrlo, se analizó la supervivencia ninfal, el tiempo de desarrollo ninfal, el sexo y morfo alar de los adultos, el peso, largo y ancho de hembras, la longevidad de los adultos y la longevidad total de los insectos, la fecundidad y fertilidad. Además, se efectuó la detección y cuantificación de ácido úrico en hembras (producto de desecho del metabolismo del nitrógeno) y se registró la coloración de la cutícula de los adultos como una medida estimativa de la melanización. Estos aportes en conjunto, contribuyen a comprender el rol que los YLS podrían desempeñar en el éxito de esta plaga del maíz.

#### Hipótesis y predicciones asociadas:

- H: Dada la participación de los YLS en la síntesis de aminoácidos, la síntesis de esteroides y el reciclaje de nitrógeno, la reducción en el número de estos endosimbiontes por acción de fungicidas sistémicos perjudica diversos aspectos de la biología de *D. kuscheli*.

- P: La reducción del número de YLS aumentará el tiempo de desarrollo ninfal del insecto y disminuirá la supervivencia ninfal, la longevidad de los adultos, el tamaño y peso individual de los adultos, la coloración de la cutícula, la fecundidad y la fertilidad. Además, aumentará el contenido de ácido úrico en los tejidos del insecto, debido a que los YLS son responsables de metabolizarlo.

## 3.2 Materiales y métodos

Los ensayos correspondientes a este capítulo se realizaron en el bioterio de la Div. de Entomología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, bajo condiciones controladas de temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humedad relativa (40%-60%) y fotoperíodo (16 h luz 8 h oscuridad), mientras que el ensayo correspondiente a la detección de ácido úrico se realizó en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP-UNLP-CONICET).

### 3.2.1 Efecto de la reducción del número de YLS por fungicidas sistémicos sobre diferentes parámetros biológicos de *Delphacodes kuscheli*

En una primera etapa, a partir de la cohorte de ninfas de tercer estadio de *D. kuscheli*, obtenida como se detalla en el Capítulo 2, sección 2.2.4.2, se evaluó el efecto de los fungicidas protioconazol (**P**), protioconazol y trifloxistrobin (**PT**), piraclostrobin y epoxiconazol (**PE**), piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad (**PEF**), picoxistrobin y ciproconazol (**PC**), tebuconazol (**T**) y agua destilada (**C**) sobre la mortalidad ninfal, el tiempo de desarrollo ninfal, la proporción de sexos y morfos alares de los insectos que lograron mudar al estado adulto y el peso, largo y ancho de las hembras emergidas. Se realizaron diez jaulas por tratamiento para cada fungicida conteniendo cinco ninfas III por jaula ( $n = 50$ ) y 15 jaulas ( $n = 75$ ) para el tratamiento control ( $n \text{ total} = 375$ ). La elección de ninfas de tercer

estadio se basó en que en los ensayos previos, los adultos obtenidos de esta manera mostraron una mayor reducción del número de YLS bajo ciertos fungicidas.

Se registró la mortalidad ninfal total (proporción de ninfas que murieron desde el inicio del experimento y no lograron mudar al estado adulto) y el tiempo de desarrollo ninfal (número de días desde la eclosión del huevo hasta la muda al estado adulto). También se registró el morfo alar (macróptero / braquíptero) de los adultos emergidos y el peso, largo y ancho de las hembras. El peso se registró individualmente utilizando una balanza analítica de 0,0001 g de precisión (Acculab Sartorius Group ALC210.4). La longitud y ancho del cuerpo se midieron bajo microscopio estereoscópico (Leica EZ5) provisto de una reglilla micrométrica, desde el extremo superior del vértex hasta el extremo final del abdomen y a nivel del ancho máximo del abdomen, respectivamente. Finalmente, se cuantificó de forma individual el número de YLS de todos los adultos entre las 0-24 h de emergidos, resultados mostrados en el Capítulo 2, sección 2.3.2.

Para evaluar diferencias entre tratamientos, en el caso de la mortalidad ninfal y de los morfos alares, se realizó una prueba de diferencia de proporciones de a pares de Chi-cuadrado, utilizando la corrección de Yates y la prueba exacta de Fisher, respectivamente. Para el análisis del tiempo de desarrollo ninfal se ajustó un modelo lineal generalizado con distribución gamma y función de enlace log. Se modeló el tiempo de desarrollo en días desde la eclosión del huevo hasta la muda al estado adulto como variable respuesta y la interacción entre las variables explicativas categóricas “tratamiento” y “sexo de los adultos”. Finalmente se modeló como variables respuesta el peso, largo y ancho de las hembras emergidas mediante un modelo lineal general de distribución normal y, dado que se detectó heterocedasticidad en el largo y el ancho, se modeló una varianza para cada tratamiento, que fue la única variable explicativa categórica en este caso.

En una segunda etapa, para la realización de los ensayos siguientes, se seleccionaron ninfas de tercer estadio y el fungicida PT como la combinación más efectiva para reducir los YLS en los adultos, mostrando porcentajes de reducción en hembras recién emergidas mayores al 80% y en machos al 70%. En insectos control y subsimbióticos se registró la longevidad total, la longevidad de los adultos, la concentración de ácido úrico en hembras; la coloración de la cutícula y atributos reproductivos como fecundidad y fertilidad.

### 3.2.2 Longevidad total de los insectos y longevidad de los adultos

Ninfas de tercer estadio de 9 días se alimentaron sobre plantas de avena aleatoriamente asignadas al tratamiento con el fungicida PT o agua destilada como control y se registraron los días transcurridos hasta la emergencia de los adultos. Luego, los adultos fueron trasladados individualmente a tubos de ensayo y se registró la cantidad de días transcurridos hasta su muerte. Los tubos fueron provistos de una hoja de avena sin tratamiento como sustrato para su alimentación. Las hojas se hidrataron con un algodón húmedo en el extremo y fueron renovadas diariamente.

Para el análisis de la longevidad total, que comprende el tiempo en días desde la aparición de ninfas I hasta la muerte de los adultos, se ajustó un modelo lineal generalizado con distribución gamma y función de enlace log. Se modeló la cantidad de tiempo en días desde la eclosión del huevo hasta la muerte de los adultos como variable respuesta y la interacción entre las variables explicativas categóricas “tratamiento” y “sexo de los adultos”. Para el análisis de la longevidad de los adultos, la variable respuesta fue el tiempo en días desde la última muda ninfal hasta la muerte del insecto. Se ajustó un modelo lineal general de distribución normal y la interacción entre las variables explicativas categóricas “tratamiento” y “sexo de los adultos”.

### 3.2.3 Detección y cuantificación de ácido úrico

Se detectó y cuantificó el contenido de ácido úrico (producto de excreción de alto contenido en nitrógeno) tanto en hembras subsimbióticas como en controles. Las mismas fueron obtenidas luego de la aplicación del fungicida PT o agua destilada respectivamente sobre plantas de avena donde se alimentaron ninfas de tercer estadio. Las hembras de 0-24 h de emergidas se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Para cada tratamiento (PT y control), se procesaron 3 muestras de 10 hembras cada una. Las hembras fueron pesadas individualmente en una balanza de precisión. Cada muestra, contenida en tubos Eppendorf de 2,5 ml, se machacó en 0,8 ml de carbonato de litio 10 µM con un micropistilo metálico. El homogenato resultante se incubó 10 min a 95 °C y se centrifugó a 10.000 g por 3 min. Del sobrenadante se extrajeron 700 µl y se le agregaron 5 volúmenes de Tris-HCl 10 µM, siguiendo el protocolo realizado por Sasaki *et al.* (1996) para la detección de ácido úrico en *N. lugens*. La presencia de ácido úrico en cada una de estas muestras se determinó mediante espectrofotometría siguiendo el protocolo del kit Uricostat enzimático AA línea líquida (Wiener Laboratorios).

Para el análisis se ajustó un modelo lineal general con distribución normal. Se modeló la concentración de ácido úrico (nmol/mg de insecto) como variable respuesta y el “tratamiento” como variable explicativa categórica.

### 3.2.4 Coloración de la cutícula

Se analizó la coloración de la cutícula como una medida estimativa de la melanización (Sinotte *et al.*, 2018) en adultos de entre tres y siete días de emergidos, controles y subsimbióticos, obtenidos a partir de ninfas de tercer estadio alimentadas sobre plantas de avena tratadas con agua destilada o el fungicida PT respectivamente. Se escogió dicha franja

temporal del desarrollo para permitir que los insectos adquirieran su coloración definitiva. Se anestesiaron con vapores de etileno entre 12 y 15 insectos por sexo y morfo alar para cada tratamiento y se fotografiaron con un microscopio estereoscópico (Leica EZ4W), con un aumento de 100x, sobre fondo blanco utilizando una misma luz y mismas condiciones para todos los casos.

Para analizar diferencias en la coloración se tomaron dos componentes importantes en la percepción del color, la saturación y el brillo, y se utilizaron como indicadores para estimar la melanización de la cutícula. Una tonalidad más oscura se asoció con niveles más elevados de melanización. En el contexto del modelo de color HSV (Hue, Saturation, Value o Brightness), la saturación indica la intensidad del color. Valores más altos representan colores vibrantes mientras que valores más bajos tienden hacia tonos de gris. El brillo se refiere a la cantidad de luz que refleja un color. Un valor alto de brillo resulta en un color más claro y más luminoso, mientras que un valor bajo produce un color más oscuro. Estos dos componentes se normalizaron a un rango de 0 (más oscuro) a 255 (más claro y brillante).

Se utilizó un software de procesamiento de imágenes desarrollado por el Doctor en Ingeniería especializado en Visión por Computadora Francisco L. Giambelluca con el fin de evaluar el valor medio de los componentes del color mencionados. Se importaron las imágenes de los insectos al software y se asignaron al azar tres cuadrículas (réplicas) de 49 píxeles sobre la imagen del escutelo por insecto y, en cada medición, se obtuvo el valor medio de saturación y brillo.

Para el análisis de estos datos se ajustó un modelo lineal generalizado mixto con distribución gamma y función de enlace log. Se modelaron la saturación y el brillo a nivel del escutelo por insecto en hembras y machos como variables respuesta y la interacción entre las variables explicativas categóricas y fijas "tratamiento" y "morfo alar". Se incluyó la variable "réplica" como aleatoria.

### 3.2.5 Atributos reproductivos

A partir de adultos control y subsimbióticos de 0-24 h de emergidos obtenidos de ninfas de tercer estadio alimentadas sobre plantas tratadas con agua destilada o el fungicida PT respectivamente, se evaluaron distintos aspectos de la biología reproductiva de *D. kuscheli*. Para esto, se separaron los adultos emergidos en 10 parejas de hembras y machos por cada tratamiento. Se colocó a cada pareja sobre una planta de avena sin ningún tratamiento confinada en una jaula de plástico PET, permitiendo así el apareamiento y oviposición, cambiando la pareja a una nueva planta cada 7 días para posibilitar la libre oviposición hasta la muerte de la hembra. Se cuantificaron las ninfas emergidas por cada pareja de cada jaula y, después de 20 días de que haya muerto la hembra, se disectaron las plantas bajo microscopio estereoscópico utilizando alfileres para cuantificar el número de huevos que permanecieron sin eclosionar en el tejido vegetal.

De cada jaula se registró como variable respuesta el tiempo transcurrido en días desde que las parejas se pusieron en contacto hasta que emergieron las primeras ninfas I, el tiempo en días que tardaron los huevos en eclosionar, la fecundidad (número de huevos totales puestos por hembra a lo largo de toda su vida) y la fertilidad (ninfas emergidas por huevos totales por hembra). Para las dos primeras variables se ajustó un modelo lineal general de distribución normal modelando una varianza para cada tratamiento debido a que se detectó heterocedasticidad. En el caso de la fecundidad, se ajustó un modelo lineal generalizado con distribución Conway-Maxwell Poisson (la cual permite modelar la sobre dispersión con respecto a una Poisson) y función de enlace log. Mientras que para analizar la fertilidad, se ajustó un modelo lineal generalizado mixto debido a que se detectó sobredispersión, y se incorporó a la "pareja" como variable aleatoria para controlarla (Harrison, 2014), con distribución

binomial y función de enlace logit. En todos los casos mencionados la variable explicativa, categórica y fija fue el “tratamiento”.

### 3.2.6 Análisis de datos

Se realizaron comparaciones de medias o de diferencia de proporciones (mortalidad ninfal y morfos alares) para evaluar la existencia de diferencias entre insectos tratados con los distintos fungicidas y controles en los parámetros biológicos mencionados.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* estadístico R versión 4.2.1 (R Core Team, 2022). Los modelos fueron realizados utilizando la función `glmmTMB` del paquete `glmmTMB` (Brooks *et al.*, 2017). Para probar los supuestos de los modelos, se utilizó el paquete `DHARMA` (Hartig, 2022). El criterio usado para la selección de modelos fue AIC. Las pruebas de hipótesis sobre los coeficientes del modelo se calcularon mediante el test de Chi-cuadrado de Wald usando el paquete `car` (Fox y Weisberg, 2019). El nivel de significancia empleado fue 0,05 y se consideraron significativas aquellas pruebas con  $P < 0,05$ . Los contrastes de Tukey y los intervalos de confianza (IC) del 95% se obtuvieron con el paquete `emmeans` (Lenth *et al.*, 2020). Los gráficos se realizaron utilizando la biblioteca `ggplot2` (Wickham *et al.*, 2020).

## **3.3 Resultados**

### 3.3.1 Efecto de la reducción de YLS por fungicidas sistémicos sobre diferentes parámetros biológicos de *Delphacodes kuscheli*

La **mortalidad ninfal**, fue significativamente diferente entre el control y los tratamientos con los fungicidas PC, P, PT y T, mientras que no se observaron diferencias con los fungicidas restantes. El tratamiento con el fungicida PC mostró la mayor proporción de ninfas muertas, con un

porcentaje de mortalidad del 66% ( $\chi^2 = 23,27$ ; gl = 1;  $P < 0,001$ ), seguido por los tratamientos con P y PT, ambos casos con un porcentaje de mortalidad ninfal del 52% ( $\chi^2 = 11,31$ ; gl = 1;  $P < 0,001$ ) y luego por el fungicida T, con un 42% ( $\chi^2 = 5,19$ ; gl = 1;  $P < 0,023$ ). Esto demostró que menos del 50% de las ninfas expuestas a los tratamientos con los fungicidas P, PT y PC, lograron alcanzar el estado adulto (**Tabla 3.1**).

**Tabla 3.1.** Mortalidad ninfal en cada tratamiento. Las comparaciones de diferencias entre proporciones se realizaron para cada fungicida respecto del control. \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ . **C**= control, **P**= protoconazol, **PT**= protoconazol y trifloxistrobin, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad y **T**= tebuconazol.

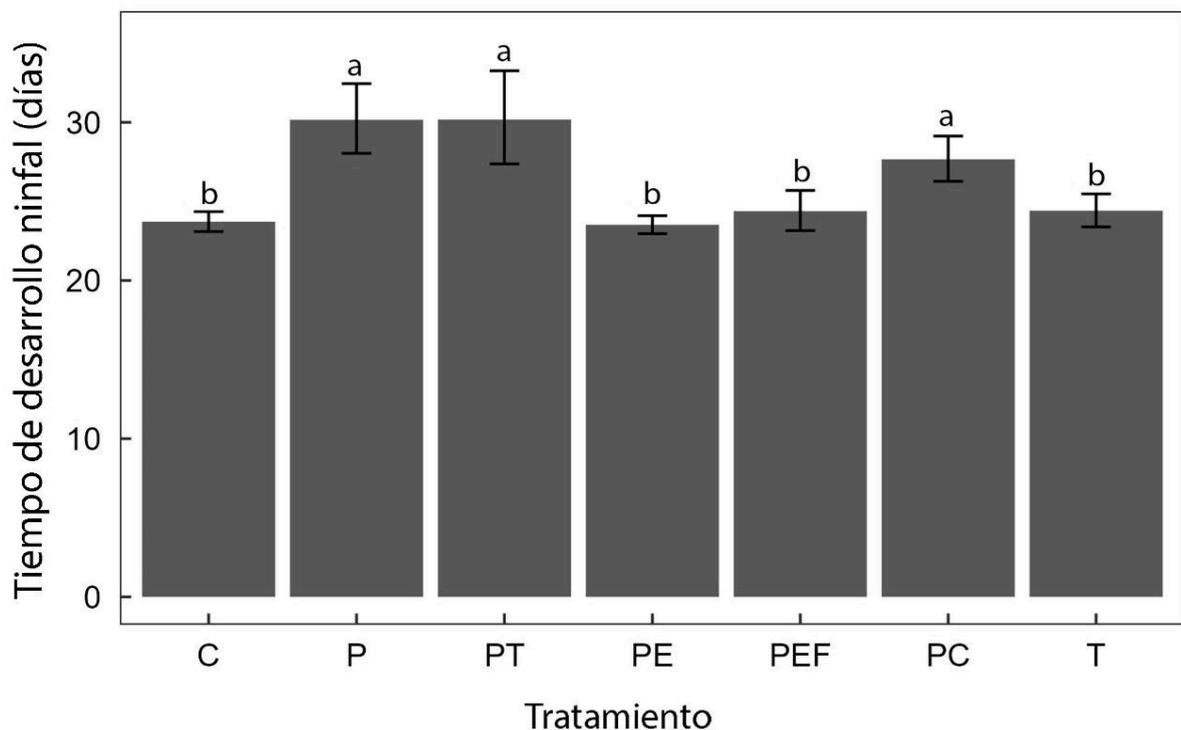
Tratamiento	N inicial	N muertos	Proporción de mortalidad	$\chi^2$	P
C	75	16	0,21		
P	50	26	0,52	11,31	0,00077***
PT	50	26	0,52	11,31	0,00077***
PC	50	33	0,66	23,27	0,0000014***
PE	50	18	0,36	2,56	0,1096
PEF	50	18	0,36	2,56	0,1097
T	50	21	0,42	5,19	0,02262*

Además, se observaron muchas ninfas muertas con la exuvia adherida al cuerpo indicando que la mortalidad ninfal ocurrió frecuentemente durante la muda (**Fig. 3.1**).



**Fig. 3.1. Mortalidad ninfal asociada a la muda.** Ejemplares de ninfas muertas con la exuvia adherida a su cuerpo luego de varios días de estar alimentándose sobre plantas tratadas con el fungicida **PT** (protioconazol y trifloxistrobin).

El **tiempo de desarrollo ninfal** fue afectado por los tratamientos ( $\chi^2=93,93$ ;  $gl=6$ ;  $P<0,001$ ) y el sexo de los adultos ( $\chi^2=15,97$ ;  $gl=1$ ;  $P<0,001$ ) siendo ambas variables significativas por sí mismas, pero no su interacción ( $\chi^2=0,43$ ;  $gl=6$ ;  $P=0,9$ ). Las ninfas alimentadas sobre plantas tratadas con los fungicidas PT, P y PC demoraron en promedio más días en alcanzar el estado adulto en comparación a las que se alimentaron sobre plantas tratadas con agua destilada (C) o sobre las tratadas con los fungicidas PE, PEF o T (**Fig. 3.2**).



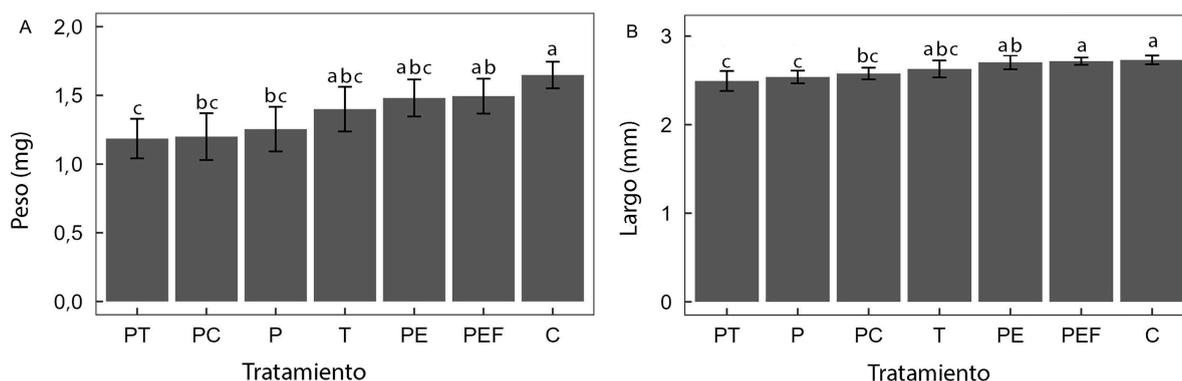
**Fig. 3.2. Tiempo de desarrollo ninfal de adultos (hembras y machos)** obtenidos a partir de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con agua destilada y fungicidas. Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los tratamientos. Total de adultos analizados por tratamiento: **C** (n=59), **P**

(n=24), **PT** (n=24), **PC** (n=17), **PE** (n=32), **PEF** (n=32), **T** (n=29). **C** =control, **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **T**= tebuconazol, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad.

En hembras, se observó una mayor proporción del **morfo alar** braquíptero en aquellas provenientes de ninfas tratadas con los fungicidas P (N total=11; Prop.= 0,91; P=0,0018) y PC (N total= 10; Prop.= 0,80; P= 0,0174) respecto a las hembras control (N total= 31; Prop. =0,35). Además, en aquellas obtenidas a partir del tratamiento con el fungicida PT, se encontraron diferencias marginales, aunque no significativas, con una alta expresión del morfo alar braquíptero (N total= 14; Prop. =0,64; P= 0,070) con respecto al control.

En machos, se observó una mayor proporción del morfo alar braquíptero en aquellos provenientes de ninfas tratadas con el fungicida PC (N total=7; Prop.= 0,57; P=0,0018) con respecto al control (N total=28; Prop.= 0,14), mientras que no se observaron diferencias en las proporciones del morfo alar braquíptero entre los machos obtenidos de los restantes tratamientos con fungicidas (**Anexo 3.5, Tabla 1**).

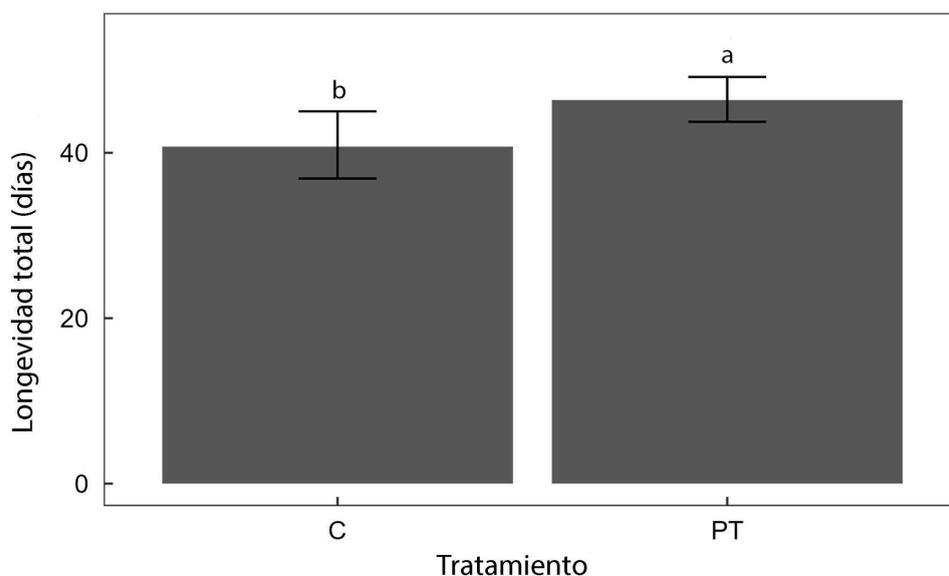
El **peso y largo** de las hembras difirió significativamente entre tratamientos ( $\chi^2 =44,73$ ; gl=6; P< 0,001 y  $\chi^2 =42,87$ ; gl=6; P< 0,001 respectivamente). Para el **ancho del abdomen**, si bien hubo un efecto del tratamiento ( $\chi^2 15,51$ ; gl= 6; P=0,017), posteriormente no se detectaron estas diferencias en las comparaciones múltiples. Las hembras obtenidas de los tratamientos con los fungicidas PE, PEF y T no difirieron significativamente en peso y largo con respecto al control, mientras que las obtenidas por los tratamientos con los fungicidas PT, P y PC fueron significativamente más livianas y exhibieron una menor longitud corporal que las hembras control (**Fig. 3.3**).



**Fig. 3.3. Peso (A) y Largo (B) de hembras** de 0-24 h obtenidas a partir de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con agua destilada y fungicidas. Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los tratamientos. Total de hembras analizadas por tratamiento en **(A)** y **(B)**: **C** (n=31), **P** (n=11), **PT** (n=14), **PC** (n=10), **PE** (n=16), **PEF** (n=18), **T** (n=11). **C**= control, **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **T**= tebuconazol, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad.

### 3.3.2 Longevidad total de los insectos y longevidad de los adultos

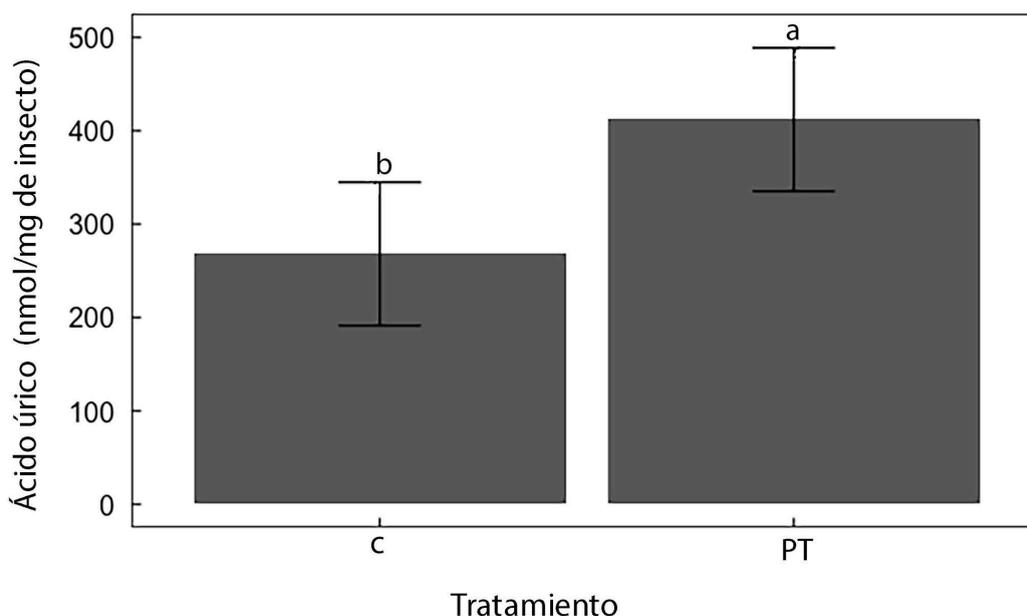
La longevidad total de los insectos, si bien no presentó una interacción significativa entre las variables explicativas ( $\chi^2=02,09$ ; gl=1; P=0,15), sí mostró diferencias entre los tratamientos ( $\chi^2=4,99$ ; gl=1; P=0,025) y el sexo ( $\chi^2=4,27$ ; gl=1; P=0,039), siendo significativamente mayor la longevidad total en días de los insectos tratados con el fungicida PT con respecto a los controles (**Fig 3.4**). Para la longevidad de los adultos, no existió interacción entre el tratamiento y el sexo ( $\chi^2= 3,59$ ; gl= 1; P= 0,058) ni se encontraron diferencias significativas entre la longevidad de los adultos control y tratados con el fungicida PT ( $\chi^2= 0,78$ ; gl= 1; P= 0,37).



**Fig. 3.4. Longevidad total de insectos control y subsimbióticos desde ninfa I hasta la muerte del adulto** obtenidos a partir de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con agua destilada (**C**= control) y el fungicida **PT** (protioconazol y trifloxistrobin). Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los tratamientos. Total de insectos analizados por tratamiento: **C** (n=24) y **PT** (n=69).

### 3.3.3 Detección y cuantificación de ácido úrico

Se detectó la presencia de ácido úrico en la totalidad de las muestras analizadas, tanto en las pertenecientes a hembras control como en las de hembras subsimbióticas. Sin embargo, su concentración, evidenciada por mayores niveles de absorbancia, fue significativamente mayor en las muestras de hembras subsimbióticas ( $\chi^2=17,788$ ; gl=1;  $P < 0,001$ ), siendo en promedio de 412 nmol/mg de insecto (IC 95% 335-489 nmol/mg de insecto) en comparación al control, con una concentración promedio de ácido úrico de 268 nmol/mg de insecto (IC 95% 191-345 nmol/mg de insecto) (**Fig. 3.5**) (**Anexo 3.5, Tabla 2**).



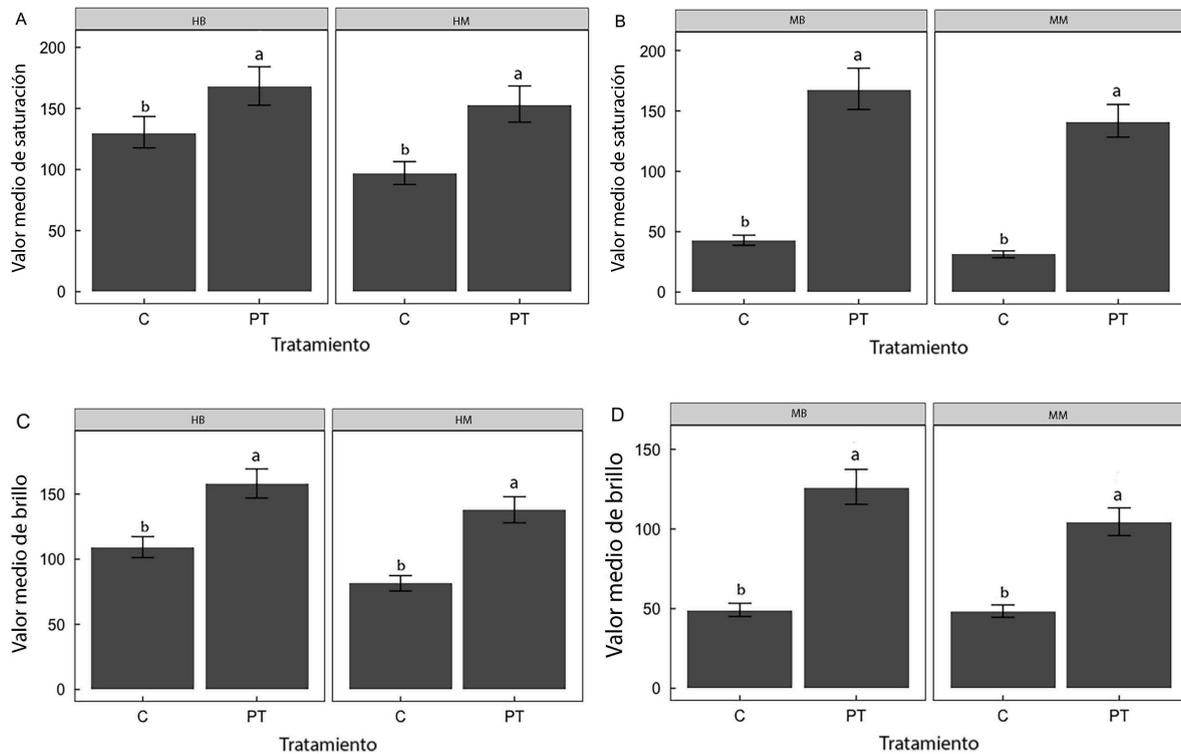
**Fig. 3.5. Ácido úrico (nmol/mg de insecto) en hembras control y subsimbióticas** obtenidas a partir de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con agua destilada (**C**= control) y el fungicida **PT** (protioconazol y trifloxistrobin). Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los tratamientos. Total de muestras analizadas por tratamiento: **C** (n=3) y **PT** (n=3).

### 3.3.4 Coloración de la cutícula

La coloración de la cutícula en hembras mostró diferencias significativas en la interacción entre el tratamiento y el morfo alar (Saturación:  $\chi^2 = 4,47$ ; gl = 1; P= 0,034 y Brillo:  $\chi^2 = 4,67$ ; gl = 1; P= 0,030). Las hembras subsimbióticas exhibieron una cutícula con tonalidades más claras y brillantes, mientras que las hembras control presentaron tonalidades castañas.

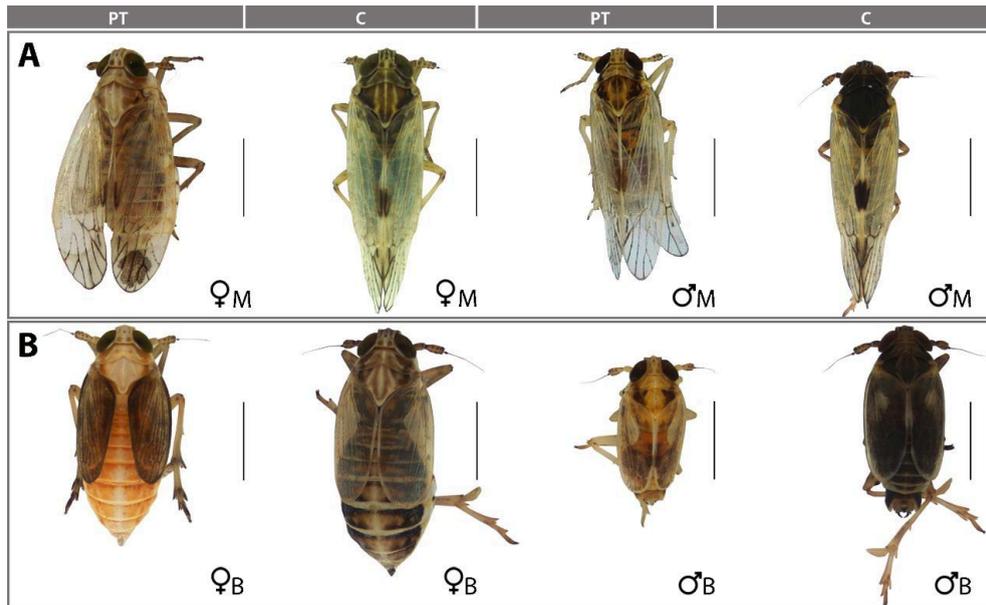
En machos se observó un patrón similar pero con diferencias entre tratamientos más notorias. Si bien en el caso de la saturación no fue significativa la interacción entre el tratamiento y el morfo alar ( $\chi^2 = 2,20$ ; gl = 1; P= 0,13), sí lo fueron estas variables explicativas individualmente (P<0,001).

El brillo se vio significativamente afectado por una interacción entre el tratamiento y el morfo alar ( $\chi^2 = 4,34$ ;  $g| = 1$ ;  $P = 0,037$ ), mostrando nuevamente tonalidades más vibrantes en la cutícula de machos subsimbióticos en comparación a los controles (**Figs. 3.6 y 3.7**).



**Fig. 3.6. Valor medio de saturación y brillo de la cutícula (A y C) de hembras y (B y D) machos control y subsimbióticos respectivamente, obtenidos a partir de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con agua destilada (C= control) y el fungicida PT (protioconazol y trifloxistrobin). Los datos de saturación y brillo se normalizaron a un rango de 0 (más oscuro) a 255 (más claro y brillante). Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el morfo alar. HB: hembras braquípteras, HM: hembras macrópteras, MB: machos braquípteros, MM: machos macrópteros.**

Además, también se observó la concentración de pigmentos en la parte superior de las alas y en las celdas terminales y distintas partes del cuerpo de los adultos subsimbióticos (**Fig. 3.7**).



**Fig. 3.7. Patrones de coloración de la cutícula.** Ejemplares de hembras y machos subsimbióticos y controles de *D. kuscheli* utilizados para evaluar la coloración de la cutícula. **(A)** Morfo alar macróptero. **(B)** Morfo alar braquíptero. **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **C**= control. Escala 1 mm.

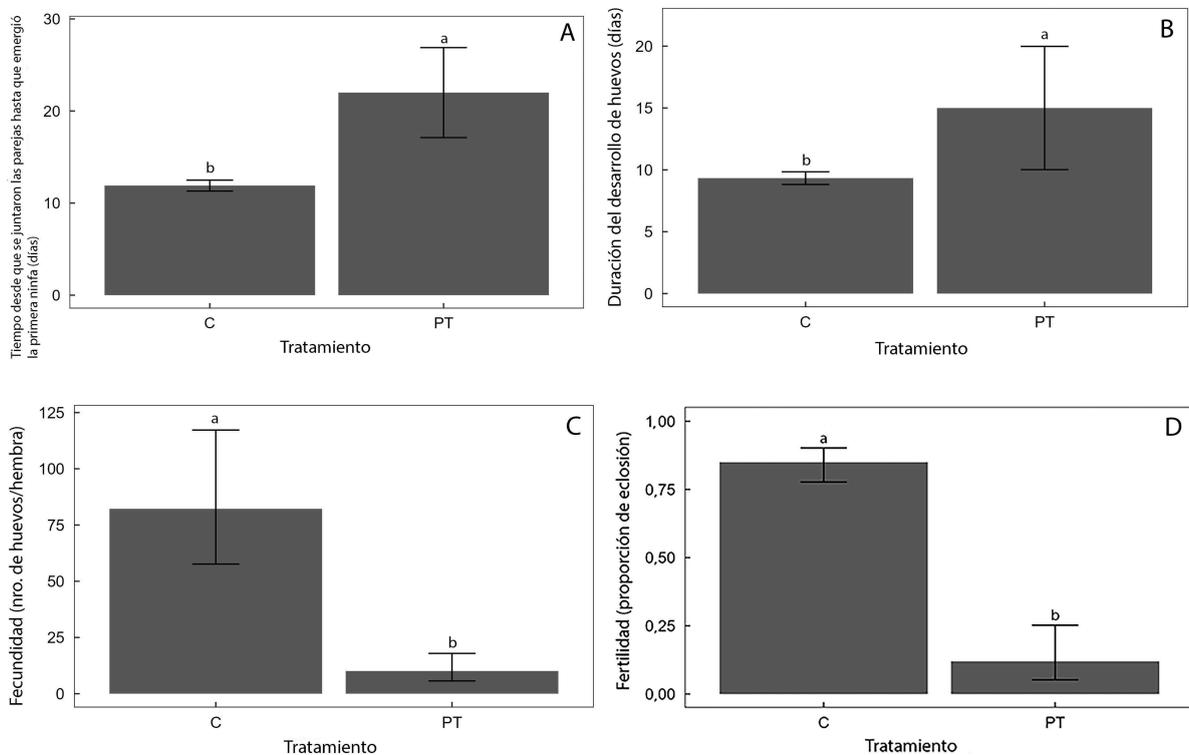
### 3.3.5 Atributos reproductivos

El tiempo transcurrido en días desde que machos y hembras se pusieron en contacto hasta que emergieron las primeras ninfas I difirió significativamente entre tratamientos ( $\chi^2= 21,54$ ;  $gl=1$ ;  $P < 0,001$ ). Las primeras ninfas obtenidas a partir de parejas subsimbióticas emergieron en un promedio de 22 días (IC 95% 17,11 - 26,89 días), en comparación a las ninfas obtenidas de parejas control, las cuales lo hicieron en un promedio de 11,9 días (IC 95% 11,31 - 12,49 días) (**Fig. 3.8A**).

El tiempo transcurrido en días desde que las hembras ovipusieron hasta la eclosión de los huevos y la observación de las primeras ninfas I, también difirió significativamente entre tratamientos ( $\chi^2= 6,81$ ;  $gl=1$ ;  $P=0,009$ ). Los huevos de las parejas subsimbióticas demoraron en promedio 15 días en eclosionar (IC 95% 10,02 - 19,98 días), mayor cantidad de tiempo que los controles, que lo hicieron en un promedio de 9,33 días (IC 95% 8,82 - 9,85 días) (**Fig. 3.8B**).

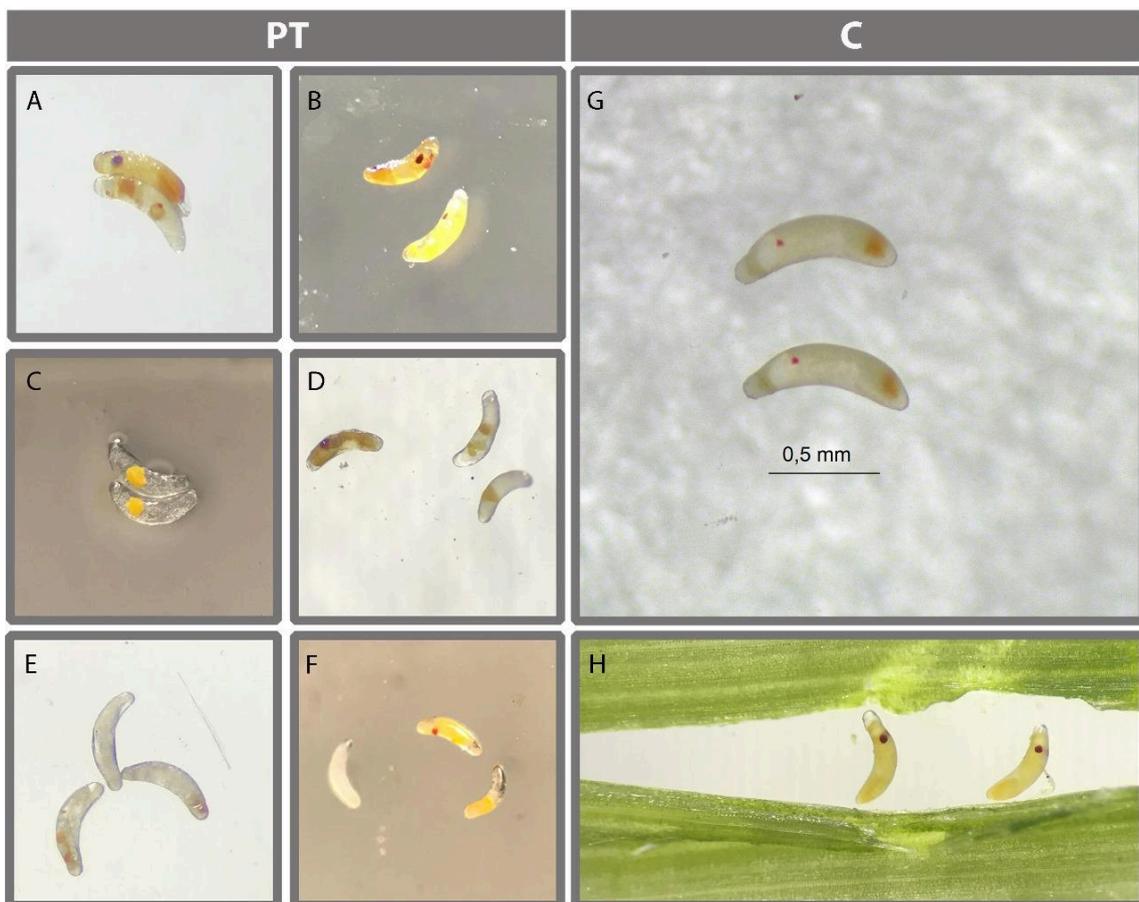
La **fecundidad** difirió significativamente entre tratamientos ( $\chi^2=37,06$ ;  $gl=1$ ;  $P < 0,001$ ). De las 10 parejas analizadas del control, todas las hembras ovipusieron, mientras que sólo seis de las 10 hembras subsimbióticas lograron hacerlo. Las hembras subsimbióticas ovipusieron en promedio 10,10 huevos (IC 95% 5,69 - 17,93 número de huevos), menor cantidad que las hembras control, con un promedio de huevos de 82,20 (IC 95% 57,64 - 117,22 número de huevos) (**Fig. 3.8C**).

La **fertilidad** difirió entre los dos tratamientos ( $\chi^2=48,98$ ;  $gl=1$ ;  $P < 0,001$ ). Mientras que para la totalidad de las hembras control se registraron huevos fértiles de los cuales emergieron ninfas I, para las hembras subsimbióticas, de las seis que lograron oviponer, solo tres de ellas produjeron huevos fértiles de los cuales emergieron ninfas I. A su vez, el porcentaje de eclosión promedio de huevos provenientes de parejas subsimbióticas fue de 12% (IC 95% 5 - 25%) significativamente menor que el control, con un porcentaje de eclosión promedio de 89% (IC 95% 78% - 90%) (**Fig. 3.8D**).



**Fig. 3.8. Atributos reproductivos de insectos control y subsimbióticos** obtenidos a partir de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con agua destilada (**C**= control) y el fungicida **PT** (protioconazol y trifloxistrobin). Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los tratamientos.

Además, se encontraron varias anomalías en muchos de los huevos de hembras subsimbióticas que no lograron eclosionar y permanecieron dentro del tejido vegetal. Estas anomalías se relacionaron principalmente con la distribución del vitelo y la ausencia de ojos rojos (estado indicativo de la maduración del embrión que normalmente se evidencia a los 5-6 días) en huevos de más de 20 días (**Fig. 3.9**). Las escasas ninfas que emergieron de las posturas de hembras subsimbióticas no superaron el tercer estadio y murieron, por lo tanto no se obtuvieron adultos en la F1 de este tratamiento.



**Fig. 3.9. Huevos de hembras subsimbióticas y control. (A-F)** Huevos de hembras subsimbióticas que permanecieron en el tejido vegetal sin eclosionar. Se observa la ausencia de ojos rojos en algunos ejemplares y una distribución atípica del vitelo. **(G-H)** Huevos típicos de hembras control. **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, fungicida utilizado para reducir el número de YLS. **C**= Control.

### 3.4 Discusión

En las simbiosis nutricionales, los microorganismos proporcionan nutrientes esenciales y participan del metabolismo que permite a sus hospederos subsistir con dietas nutricionalmente deficientes, por lo que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo, crecimiento y reproducción de los insectos (Moran *et al.*, 2005; Rosenblueth *et al.*, 2018). Para comprender las interacciones mutualistas y su impacto en distintos parámetros biológicos de *D. kuscheli*, se utilizaron seis fungicidas sistémicos aplicados sobre plantas de avena de las que se alimentaron los insectos con el fin de reducir el número de sus principales endosimbiontes nutricionales, los YLS. Los fungicidas P, PT y PC fueron los únicos en reducir significativamente el número de YLS en los adultos recién emergidos con respecto al control, mostrando en hembras reducciones mayores al 80% y en machos, mayores al 60%, resultados detallados en el Capítulo 2, sección 2.3.2. Consecuentemente, en los tratamientos con estos tres fungicidas, la mortalidad ninfal superó el 50%, por lo tanto, menos de la mitad de los insectos analizados lograron alcanzar el estado adulto. Además, la mortalidad ocurrió frecuentemente al momento de la muda. Los mismos fungicidas también afectaron el tiempo de desarrollo y las ninfas demoraron en promedio entre cuatro y siete días más que los controles en alcanzar el estado adulto. Resultados similares fueron informados tanto en *D. kuscheli* (de la Fuente *et al.*, 2019) como en *L. striatellus* (Noda y Saito, 1979) y *N. lugens* (Chen *et al.*, 1981b; Hou y Lee, 1984) cuando se redujeron sus YLS mediante un tratamiento de “shock térmico”. En este sentido,

Carvalho *et al.* (2010) demostraron que cuando los esteroides son limitados en la dieta, las larvas de *Drosophila* crecen lentamente y dan lugar a adultos pequeños o incluso detienen el crecimiento y el desarrollo. Los insectos carecen de los genes necesarios para la biosíntesis de esteroides y generalmente los obtienen de sus dietas (Noda *et al.*, 1979; Noda y Koizumi, 2003). La savia del floema es una fuente pobre en colesterol (Behmer *et al.*, 2011; 2013). Los delfácidos como *N. lugens* obtienen el colesterol u otros esteroides de sus YLS, que a diferencia de la mayoría de las bacterias, tienen la capacidad de sintetizarlos (Wetzel *et al.*, 1992; Behmer y Nes, 2003; Douglas, 2009). En su estudio, Xue *et al.* (2014) descubrieron que *N. lugens* y los YLS desarrollaron un sistema interdependiente para la biosíntesis de esteroides. Los hongos comúnmente producen ergosterol, un componente de las membranas celulares que funciona de manera similar al colesterol en las células animales. Los investigadores identificaron las vías metabólicas en los YLS y su hospedero para convertir el compuesto ergosta-5,7,24(28)-trienol en colesterol. Los esteroides cumplen cuatro funciones críticas en los insectos: (i) son componentes importantes de las membranas celulares, modulando la permeabilidad, la fluidez, la identidad de las organelas y la función de las proteínas, (ii) son precursores de muchas hormonas, incluida la hormona de la muda 20-hidroxiecdisona y su precursora, la ecdisona, (iii) desempeñan un papel en la regulación de genes implicados en procesos de desarrollo y (iv) actúan como moléculas de señalización (Behmer *et al.*, 2013; Krishnaiah, 2014). En consecuencia, la alta mortalidad y el retraso en el tiempo de desarrollo ninfal en individuos subsimbióticos de *D. kuscheli* podría relacionarse con la disminución de la síntesis de esteroides por parte de los YLS.

En la colonia de *D. kuscheli* ocasionalmente se observan hembras braquípteras y con menor frecuencia, machos braquípteros. Sin embargo, en los experimentos se observó que más del 50% de las hembras subsimbióticas obtenidas con los fungicidas P, PC y PT fueron braquípteras. En los machos, la proporción de individuos braquípteros bajo

estos mismos fungicidas fue elevada, siendo en PC mayor al 50%. El morfo alar en delfácidos está regulado por múltiples genes y puede ser modificado por factores ambientales como la densidad de población, la calidad de la planta hospedera, la temperatura o el fotoperiodo (Zera y Denno, 1997). Aunque el dimorfismo alar fue ampliamente estudiado en este contexto (Fitzgerald y Tipping, 2013; Lin *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020), aún no se ha explorado si existe una relación con los YLS. Interesantemente, un estudio realizado en el áfido *Sitobion avenae* (F.) por Zhang *et al.* (2015a) demostró que la reducción con antibióticos del endosimbionte obligado *Buchnera*, disminuyó significativamente la proporción de morfos alados en relación a los no alados. Los autores sugirieron que la ausencia de *Buchnera* podría interferir con la normal adquisición de nutrientes alterando la expresión fenotípica a través de las generaciones e incrementando de esta manera la producción de individuos ápteros. Esta evidencia sobre la implicancia de los endosimbiontes obligados en el dimorfismo alar de su insecto hospedero, incentiva a explorar en profundidad la participación de los YLS sobre el dimorfismo alar en *D. kuscheli*.

Asimismo, tanto el peso como el largo de las hembras obtenidas a partir de los fungicidas P, PT y PC fueron menores con respecto al control. Dicha observación ha sido documentada en delfácidos cuando se redujeron experimentalmente sus YLS (Vega y Dowd, 2005; Chen *et al.*, 2011; Ferrater *et al.*, 2013) así como en otros grupos de insectos al eliminar sus endosimbiontes nutricionales (Fukatsu y Hosokawa, 2002; Douglas, 2009; Nguyen *et al.*, 2020). Particularmente, este fenómeno fue documentado por Wilkinson e Ishikawa (2001), quienes examinaron en paralelo el impacto de la pérdida de *Buchnera* en el áfido *Acyrtosiphon pisum* (Harris) mediante el uso de antibióticos, y de los YLS en *N. lugens* mediante un tratamiento de “shock térmico”. Aunque la posición filogenética de los endosimbiontes difiere entre las dos especies, el tema subyacente de la simbiosis nutricional es el mismo. La pérdida de los

endosimbiontes conllevó a una reducción en el peso de los insectos y en la tasa de crecimiento individual.

Los insectos subsimbióticos mostraron una longevidad total mayor como consecuencia de un período ninfal más prolongado, por lo que demoraron más tiempo en alcanzar el estado adulto. La longevidad de los adultos subsimbióticos en cambio, fue similar al control. Resultados similares fueron publicados por Lee y Hou (1987) para *N. lugens*. Esta información podría indicar que la presencia de los YLS sería más crítica durante el desarrollo ninfal, etapa en la que los insectos están en activo crecimiento y deben mudar varias veces hasta finalmente alcanzar el estado adulto. En cambio, en el estado adulto, la disminución de los YLS no afectaría la longevidad de los mismos.

Las hembras subsimbióticas también se distinguieron por la cantidad de ácido úrico acumulado en su cuerpo. Sasaki *et al.* (1996) y Hongoh e Ishikawa (1997), postularon que un posible papel desempeñado por los YLS en *N. lugens* es el reciclaje de nitrógeno, es decir, la conversión de productos de desecho nitrogenados del insecto en compuestos de valor nutricional. Al igual que lo que ocurrió con las hembras de *D. kuscheli*, los investigadores detectaron una cantidad considerable de ácido úrico en los tejidos de los insectos analizados y el contenido fue notablemente mayor en los insectos subsimbióticos obtenidos a partir del tratamiento de “*shock* térmico”. En ese momento, se le adjudicó únicamente a los YLS la capacidad de reciclar el ácido úrico a través de la enzima uricasa que ellos poseen. Posteriormente, Xue *et al.* (2014), identificaron un sistema más complejo donde la capacidad genética para el reciclaje de nitrógeno es complementaria entre el insecto y sus YLS. Los investigadores destacaron que las vías metabólicas dejarían de funcionar tanto si el insecto o sus YLS perdieran solo uno de los genes que codifican a las enzimas involucradas. Como destacaron Xue *et al.* (2014) y Fan *et al.* (2015), la estrecha cooperación de las enzimas codificadas por los dos genomas (el del insecto y el de sus YLS) sirve para transformar el urato en amoníaco, que luego se

transforma en glutamato y glutamina, dos precursores para la biosíntesis de aminoácidos esenciales. Esta vía de reciclaje de nitrógeno sirve como fuente adicional de aminoácidos para el insecto, siendo una de las adaptaciones que les permiten mantenerse en una dieta donde el nitrógeno disponible y los aminoácidos esenciales (aquellos que no pueden ser sintetizados por los animales) son limitados (Mattson, 1980; Douglas, 2006; Hansen y Moran, 2013). También se ha reportado la participación de endosimbiontes en el reciclaje de productos nitrogenados en otros insectos hemípteros, como en el sistema integrado por *Dactylopius* (Coccoidea: Dactylopiidae) y sus endosimbiontes fúngicos (Vera-Ponce de León *et al.*, 2016), en *Parastrachia japonensis* (Scott) (Parastrachiidae) y su endosimbionte bacteriano *Erwinia* (Kashima *et al.*, 2006), y en otros insectos menos relacionados filogenéticamente, como la cucaracha *Blattella germanica* (L.) y el endosimbionte bacteriano *Blattabacterium* (Valovage y Brooks, 1979; Patino-Navarrete *et al.*, 2014) y el flebótomo *Phlebotomus perniciosus* (Newstead) y un simbiote fúngico (Martin *et al.*, 2018). En todos los casos mencionados anteriormente, se observó una acumulación de ácido úrico mayor que en los controles ante la reducción de los simbiotes (Hansen *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2022).

Otra particularidad de los adultos subsimbióticos de *D. kuscheli* fue la coloración clara y amarilla de la cutícula en comparación a los adultos control, de coloración castaña oscura. Este fenómeno ya había sido observado por Noda y Saito (1979) en adultos subsimbióticos del delfácido *L. striatellus*. La cutícula de los insectos consiste principalmente en una matriz entrecruzada de proteínas cuticulares y quitina, un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (Andersen, 2010; Pan *et al.*, 2018). El endurecimiento y pigmentación de la capa externa de la cutícula, la exocutícula, depende de dos procesos: esclerotización y melanización, que dan como resultado la rigidez y coloración de la misma. La cutícula recién sintetizada es suave y pálida, pero se vuelve más fuerte (esclerotizada) y más oscura (pigmentada) al cabo de varias horas o días

(Andersen, 2010; Moussian, 2010). El primer paso en las vías de esclerotización y pigmentación es la hidroxilación del aminoácido aromático tirosina. Sin embargo, los insectos no pueden sintetizar el anillo de benceno de los aminoácidos aromáticos (Evison *et al.*, 2017). Por lo tanto, deben obtener estos compuestos a través de su dieta o de la asociación con microorganismos que puedan producirlos a través de la vía del shikimato. Esta vía, conocida también como ruta del ácido shikímico, (presente en plantas, bacterias y hongos), involucra un conjunto de reacciones metabólicas de gran relevancia en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, así como de una extensa gama de metabolitos secundarios (Douglas, 2016; Kiefer *et al.*, 2023). Se ha probado que la contribución de los endosimbiontes a la biosíntesis de la cutícula, ha evolucionado múltiples veces de manera convergente en los distintos grupos de insectos (Kiefer *et al.*, 2021). De hecho, se ha informado el aprovisionamiento de tirosina por parte de endosimbiontes bacterianos en múltiples taxones de insectos herbívoros, como es el caso de varios escarabajos (Anbutsu *et al.*, 2017; Hirota *et al.*, 2017; Kiefer *et al.*, 2021; Kanyile *et al.*, 2022), hormigas (Duplais *et al.*, 2021) y chinches (Kikuchi *et al.*, 2016). En los ejemplos mencionados, los insectos que sufrieron una reducción o eliminación de sus endosimbiontes, dieron como resultado un fenotipo con una cutícula más delgada y/o cambios en la pigmentación cuticular, mostrando una cutícula menos melanizada. Wan *et al.* (2014) lograron detectar en *N. lugens* que los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, derivan de una vía shikimato de sus YLS y que los endosimbiontes compensan, al menos parcialmente, las necesidades de aminoácidos del insecto hospedero como ya ha sido postulado por otros autores (Wilkinson e Ishikawa, 2001; Chen *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2014). La reducción de los YLS en *N. lugens*, disminuyó significativamente la proporción de varios aminoácidos, entre ellos la tirosina, afectando a la formación de proteínas en general (Wan *et al.*, 2014). Por consiguiente, se podrían asociar las deficiencias que presentan los

adultos subsimbióticos de *D. kuscheli*, entre ellas, el fenotipo claro y la pigmentación anormal de su cutícula, a la marcada reducción del número de YLS que conlleva a la imposibilidad de los endosimbiontes de cumplir apropiadamente sus funciones. A su vez, Evison *et al.* (2017) descubrieron que los escarabajos seleccionados artificialmente según patrones extremos de coloración cuticular (oscuros y claros) tenían cutículas más gruesas y menos porosas cuando eran más oscuras, lo que demostró que el color covaría con las dos características cuticulares arquitectónicas. Afecciones en la cutícula de insectos subsimbióticos no solo podrían producir una menor resistencia a la desecación y una menor aptitud física en condiciones ambientales desfavorables, como sucede en algunos gorgojos (Engl *et al.*, 2018), sino que también podrían dejar a los insectos más expuestos al ataque de enemigos naturales, especialmente de hongos patógenos que penetran activamente por la cutícula (Lemoine *et al.*, 2020; Kanyile *et al.*, 2022). Por otro lado, el efecto sobre la coloración de los insectos podría influir en la interacción predador-presa (Wittkopp y Beldade, 2009).

Con respecto a los atributos reproductivos evaluados, se vio negativamente afectada la descendencia de los adultos subsimbióticos obtenidos a partir del tratamiento con el fungicida PT con respecto a los controles. Las hembras tardaron mayor cantidad de días en madurar sexualmente, solo el 60% fue capaz de oviponer y solo el 30% de las posturas eclosionaron. Asimismo, hubo un retraso en el tiempo del desarrollo embrionario con respecto al control. A su vez, el número de huevos y de ninfas fue menor y, mientras que la F1 del control alcanzó el estado adulto, las ninfas provenientes de insectos subsimbióticos no superaron el tercer estadio y finalmente murieron. Similares resultados fueron obtenidos cuando se redujo el número de YLS mediante el tratamiento de “*shock térmico*” en *D. kuscheli* (de la Fuente *et al.*, 2019) y por microinyección de un fungicida en *N. lugens* (Shentu *et al.*, 2019). Lee y Hou (1987) sugirieron que el desarrollo embrionario y postembrionario de

chicharritas subsimbióticas se vieron afectados debido a la ausencia de ciertas proteínas sintetizadas por intermedio de los YLS, registrando también una reducción en la eclosión de los huevos. Como ya se mencionó, Xue *et al.* (2014) demostraron a partir de estudios genómicos que los YLS son capaces de proporcionar aminoácidos esenciales que el delfácido *N. lugens* no puede sintetizar. El análisis de la secuencia del genoma de los YLS indica que los endosimbiontes, conservan vías de síntesis de al menos 10 aminoácidos esenciales y que son altamente complementarias con las del insecto. También Wilkinson e Ishikawa (2001) demostraron que en insectos subsimbióticos se reduce la cantidad de proteínas por unidad de peso fresco. Por otro lado, ha sido ampliamente documentado tanto en estudios de laboratorio como a campo, que el desempeño de distintas chicharritas se ve favorecido por el aporte de fertilizantes nitrogenados (Preap *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006; Lu y Heong; 2009; Horgan *et al.*, 2016). Como sucede en otros insectos, particularmente las hembras requieren cantidades sustanciales de nitrógeno disponible y una fuente de aminoácidos esenciales para la formación y posterior maduración exitosa de sus huevos (Awmack y Leather, 2002; Ben-Yosef *et al.*, 2014). Debido a que el principal aporte de aminoácidos (a través de la síntesis y el metabolismo del ácido úrico) en delfácidos lo realizan los YLS, es posible explicar por qué se vieron tan afectadas las características reproductivas evaluadas en los descendientes de *D. kuscheli* subsimbióticos. Además, como fue documentado por Liljesthröm *et al.* (2017) y se mostró en el capítulo 2 de esta tesis, el número de YLS en hembras control de *D. kuscheli* aumenta en la etapa reproductiva, lo que podría relacionarse con la alta demanda energética para la producción de huevos y la transmisión transovarial de los endosimbiontes a la descendencia. La reducción del número de YLS en más de un 80%, podría impedir que las hembras logren transferir una cantidad óptima de YLS a la siguiente generación. La disminución en la fecundidad también fue reportada en otras especies de insectos en las que se redujeron o

eliminaron los endosimbiontes nutricionales (Douglas, 1998; Pais *et al.*, 2008; Sinotte *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2020).

Una observación interesante para destacar es la gran variación individual observada en los insectos subsimbióticos en distintos parámetros biológicos evaluados, mostrando, a diferencia de los controles, una desincronización por ejemplo en el tiempo de desarrollo ninfal y los días que demoraron los huevos en eclosionar, factores que pueden afectar la dinámica de poblaciones naturales ante presiones ambientales o ante la presencia de depredadores.

Es importante mencionar a la hora de formular conclusiones que, si bien el tratamiento utilizado para reducir a los YLS pudo haber afectado de forma inespecífica al insecto o al resto de su microbiota no fúngica, los efectos observados sobre el fenotipo así como la disminución general del *fitness*, concuerdan con estudios previos que demostraron mediante técnicas moleculares y de reducción de endosimbiontes bacterianos con antibióticos, la relación de estos efectos con la reducción de los endosimbiontes nutricionales (Vega y Dowd, 2005; Ferrater *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2015).

En conjunto, la imposibilidad en los insectos subsimbióticos de que los YLS sinteticen apropiadamente aminoácidos (entre ellos la tirosina), la dificultad de metabolizar el ácido úrico y obtener así un recurso nitrogenado extra, y la disminución en el aprovisionamiento de esteroides, podrían explicar las deficiencias observadas sobre los parámetros biológicos analizados en *D. kuscheli*. Mediante la experimentación *in vivo*, fue posible estudiar la interacción entre el insecto y sus endosimbiontes, comprender su función biológica y evaluar cómo la manipulación de estos microorganismos afectó negativamente el desempeño del hospedero. Este tipo de investigación es relevante no sólo para comprender la interacción de los YLS con *D. kuscheli* y, potencialmente con otras especies relacionadas, sino también, para el desarrollo de nuevas estrategias para el manejo integrado de plagas.

### 3.5 Anexo

**Tabla 1.** Morfos alares de hembras y machos. En las columnas se indican los tratamientos, el total de hembras **(A)** y de machos **(B)** analizados, el total de braquípteros y macrópteros, la proporción de braquípteros y las diferencias en la proporción de braquípteros de cada tratamiento en comparación al control, obtenida mediante la Prueba exacta de Fisher.  $P > 0,05 = ns$ , . = marginalmente significativo; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ . **C**= control, **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad y **T**= tebuconazol.

#### A

Hembras	N total	Braquípteras	Macrópteras	Prop. braquípteras	P
C	31	11	20	0,35	
P	11	10	1	0,91	0,0018***
PT	14	9	5	0,64	0,0700.
PC	10	8	2	0,80	0,0174*
PE	16	7	9	0,44	0,4041 ns
PEF	18	5	13	0,28	0,4097 ns
T	11	4	7	0,36	0,6164 ns

#### B

Machos	N total	Braquípteros	Macrópteros	Prop. braquípteros	P
C	28	4	24	0,14	
P	13	3	10	0,23	0,3885 ns
PT	10	2	8	0,20	0,5075 ns
PC	7	4	3	0,57	0,0335*
PE	16	2	14	0,12	0,6242 ns
PEF	14	1	13	0,07	0,4525 ns
T	18	0	18	0,00	0.1255 ns

**Tabla 2.** Ácido úrico (nmol/mg de insecto) en hembras control y subsimbióticas obtenidas a partir de ninfas alimentadas desde el tercer estadio sobre plantas tratadas con agua destilada (**C**= control) y el fungicida **PT** (protioconazol y trifloxistrobin). Se muestra el total de hembras analizadas por muestra, los valores de absorbancia y la concentración de ácido úrico obtenida.

Tratamiento	N hembras	Absorbancia (nm)	Concentración de ácido úrico (nmol/mg de insecto)
C	10	0,479	304,406
C	10	0,345	193,236
C	10	0,520	306,855
PT	10	0,854	447,959
PT	10	0,862	401,208
PT	10	0,796	386,834

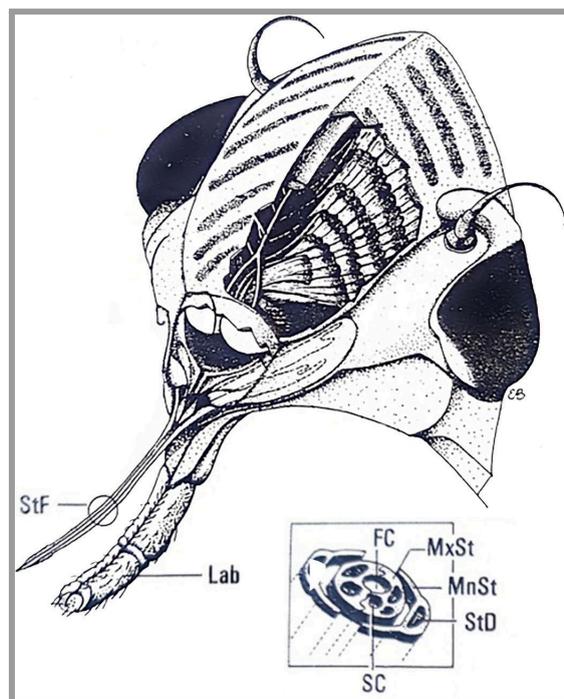
# CAPÍTULO 4

Efecto de la reducción del número de  
**YLS** sobre el comportamiento  
alimentario de *Delphacodes kuscheli*



## 4.1 Introducción

Los Hemiptera exhiben una amplia gama de hábitos alimenticios. Aunque la mayoría son fitófagos, es decir que se alimentan principalmente de savia o en menor medida del contenido de células parenquimáticas de las plantas, también se encuentran especies hematófagas que se alimentan de sangre o hemolinfa, y depredadoras (Dolling, 1991). Presentan un aparato bucal de tipo picador suctor que consiste en un rostro, formado por la proyección del labio, el cual aloja un par de maxilas y un par de mandíbulas estiliformes, los estiletes (**Fig. 4.1**). Estos estiletes actúan en conjunto perforando tejidos y permitiendo succionar líquidos mientras que el labio les proporciona soporte. Los estiletes maxilares son los más internos y se encuentran interconectados a través de crestas y ranuras (mecanismo de entrelazado). Los estiletes mandibulares se ubican por fuera rodeando completamente a los estiletes maxilares (Hao *et al.*, 2016). Internamente en la unión de las maxilas quedan formados dos canales, el canal salival (ventral) por el que desciende la saliva que se inyecta en el tejido vegetal y el canal alimentario (dorsal) que funciona como canal de succión por el que asciende el alimento (Backus, 1985).



**Fig. 4.1. Vista ventral de la cabeza de un Hemiptera Auchenorrhyncha.** Detalle en sección transversal del fascículo del estilete (StF) que muestra el canal alimentario (FC), el canal salival (SC), los canales dendríticos (StD) y el mecanismo de entrelazado. MnSt: estilete mandibular, MxSt: estilete maxilar, Lab: Labio. Modificado de Backus (1985).

Dentro del reino animal, solo algunos taxones de hemípteros son capaces de utilizar la savia del floema como fuente principal de alimento (Douglas, 2016; Bell-Roberts *et al.*, 2019; Ankrah *et al.*, 2020). Este tipo de alimentación se observa en la mayoría de los Sternorrhyncha, grupo que incluye a las moscas blancas, pulgones, cochinillas y psílidos, muchos Auchenorrhyncha y la mayoría de los Heteroptera fitófagos, entre ellos ciertos Pentatomidae y Coreidae (Dolling, 1991). La savia floemática es una dieta desequilibrada para los animales, con altas tasas de azúcares/aminoácidos y de aminoácidos no esenciales/esenciales (Raven, 1983; Douglas, 2006). Todos los hemípteros que se alimentan de savia establecen relaciones mutualistas obligadas con microorganismos principalmente de origen bacteriano o fúngico que transmiten verticalmente a la descendencia y que aportan nutrientes que escasean en la dieta de estos insectos. En los Sternorrhyncha y Auchenorrhyncha, los microorganismos son intracelulares y están alojados en células específicas, mientras que en los Heteroptera son extracelulares y se localizan en divertículos especializados del intestino (Buchner, 1965; Douglas, 1989). Algunos grupos como los Typhlocybae (familia: Cicadellidae), que se alimentan del contenido celular de las células del mesófilo (lo que resulta algo más nutritivo), carecen de endosimbiontes obligados intracelulares (Buchner, 1965; Bell-Roberts *et al.*, 2019). Esto sugiere que los microorganismos son ventajosos para los insectos que se alimentan de savia pero no necesariamente para los que poseen dietas más complejas.

La savia del floema presenta barreras nutricionales para su consumo que solo los hemípteros que la utilizan como dieta principal han logrado

superar. Esta fuente de alimento es rica en carbohidratos, pero pobre en aminoácidos esenciales (Mattson, 1980; Raven, 1983; Sandström y Moran, 1999). Dichas limitaciones pueden describirse como la "barrera del azúcar" y la "barrera del nitrógeno" (Douglas, 2006). En parte, el éxito de los insectos alimentadores del floema se debe por un lado a las adaptaciones en las piezas bucales y a su fisiología, y por otro, a la contribución nutricional de sus endosimbiontes mutualistas. Los compuestos dominantes en la savia del floema son los azúcares derivados de la fijación fotosintética de carbono, lo que representa una alta molaridad en los tejidos del insecto. Mediante distintas adaptaciones, los insectos logran la osmorregulación interna, la hidrólisis del azúcar mediante enzimas y la excreción de una melaza azucarada conocida como *honeydew* (Sōgawa, 1982; Pompon *et al.*, 2011), acciones en las cuales no parecen estar involucrados los simbiosiontes. A su vez, los insectos que se alimentan de la savia del floema, están limitados por el nitrógeno de dos maneras: en la cantidad total de nitrógeno disponible y en la calidad del nitrógeno o su composición. La calidad del nitrógeno parece ser lo más relevante ya que el contenido de aminoácidos esenciales de la savia del floema suele ser insuficiente para soportar el desarrollo de dichos insectos (Douglas, 2006). En el caso del delfácido *D. kuscheli*, se cree que sus principales endosimbiontes fúngicos obligados, los YLS, sintetizan y proporcionan los aminoácidos esenciales necesarios, lo que les permite superar la barrera del nitrógeno y utilizar la savia del floema como principal recurso alimenticio (Brentassi y Remes Lenicov, 2007; Brentassi *et al.*, 2019).

El estudio del comportamiento alimentario de los insectos proporciona información sustancial sobre su biología, ecología y evolución. En los Auchenorrhyncha, comienza con la llegada del insecto a una potencial planta hospedera. Una vez sobre ella el insecto procede a realizar una serie de comportamientos estereotípicos los cuales fueron caracterizados por Backus (1985). Si los estímulos son los adecuados, la secuencia de estos comportamientos consiste inicialmente en la

exploración de la superficie vegetal, durante la cual el insecto camina, se orienta y selecciona una posición particular para iniciar la exploración a través de los sensores ubicados en el extremo del labio. Luego de repetidos testeos, el labio se presiona sobre la superficie vegetal y los estiletes son insertados (fase de prueba del estilete). La penetración de los estiletes es mediada por secreciones salivales que se solidifican y forman una estructura tubular conocida como vaina del estilete (*stylet sheath*), constituida principalmente de material lipoproteico y cuya formación resulta fundamental para la alimentación (Miles, 1972; Sōgawa, 1982; Wang *et al.*, 2008). Una vez que se selecciona el tejido apropiado para la alimentación comienza la ingestión de los fluidos. Durante este proceso las glándulas salivales también secretan saliva acuosa (*watery saliva*) la cual contiene enzimas digestivas y ayuda a la digestión de la savia vegetal. Finalmente, los estiletes son retirados de la planta (prueba de terminación) mientras simultáneamente ocurre la salivación y permanecen en el tejido vegetal las vainas del estilete.

En los miembros de la familia Delphacidae a la que pertenece *D. kuscheli* la alimentación ocurre principalmente en el floema. Esto ha sido demostrado a través de la localización de las vainas del estilete en el tejido floemático de la planta, la composición química de la melaza, la coincidencia de la excreción al momento en que los insectos se alimentan del floema y, fundamentalmente, a través del monitoreo electrónico del comportamiento alimentario (Sōgawa, 1982; Cook y Denno 1994; Brentassi, 2004; Brentassi y Remes Lenicov, 2007; Brentassi *et al.*, 2019).

Una herramienta especialmente útil para estudiar el comportamiento alimentario en insectos hemípteros alimentadores de la savia del xilema o floema es la técnica de **Gráfico de Penetración Eléctrica** o también llamada **Electropenetrografía**, ambas abreviadas como **EPC** (del inglés **Electrical Penetration Graph**). Dicha técnica permite analizar, cuantificar y comparar el comportamiento de exploración, prueba e ingestión en tiempo real que los insectos picadores succionadores realizan

mediante la inserción de los estiletes en una planta hospedera (Tjallingii, 1985; Seo *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2022). Consiste en adherir electrodos al insecto para registrar las corrientes eléctricas generadas durante la alimentación sobre una planta. Las fluctuaciones de voltaje generalmente ocurren en una serie de patrones distintivos llamados “*waveforms*” o formas de onda, las cuales caracterizan a las diferentes actividades de los estiletes dentro del tejido vegetal (Sarria *et al.*, 2009). Estas ondas son analizadas mediante un *software* incluido en el equipo, lo que brinda la oportunidad de catalogar detalladamente las actividades de los estiletes durante la alimentación. La evidencia que apoya la correlación de los patrones de ondas eléctricas con la salivación y la ingestión en los distintos tejidos de la planta se obtiene principalmente mediante la localización histológica de las puntas de los estiletes en el tejido vegetal (o de la finalización de los rastros salivales) en el momento del último patrón de onda realizado y mediante el análisis de la melaza excretada (McLean y Kinsey, 1967, Seo *et al.*, 2009). La ocurrencia, secuencia y duración de cada evento de penetración del estilete (como por ejemplo el tiempo hasta la primera prueba, el tiempo total de prueba o la duración de la alimentación en el xilema y floema) se pueden interpretar utilizando varios parámetros de longitud y formas de onda (Sandanyaka *et al.*, 2017). Esta técnica fue utilizada por primera vez en áfidos por Mc Lean y Kinsey (1964) con corriente alterna (AC por sus siglas en inglés) y posteriormente fue mejorada por Tjallingii (1978) usando corriente continua (DC por sus siglas en inglés) para detectar cuándo, dónde y cómo el insecto inserta sus estiletes en los distintos tejidos de una planta (Backus *et al.*, 2005). Luego, EPG se incorporó en la investigación sobre el comportamiento alimentario de otros hemípteros (Miranda *et al.*, 2009; Chuche *et al.*, 2017; Sandanyaka *et al.*, 2017; Carpane y Catalano, 2022), incluidos los delfácidos (Seo *et al.*, 2009; Ghaffar *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2022; Kang *et al.*, 2022). Desde entonces, se ha utilizado para comparar patrones de alimentación en distintos grupos de insectos y bajo diferentes condiciones (Yang *et al.*,

2017), preferencias de los insectos por distintas plantas hospederas (Brentassi *et al.*, 2019; Carpane y Catalano, 2022), resistencia de las plantas hospederas a los insectos (Seo *et al.*, 2010) y en la dinámica de transmisión de patógenos, la cual está altamente relacionada con las actividades realizadas por los insectos en el floema (Li *et al.*, 2016).

En este capítulo de tesis se aborda el tercer objetivo propuesto: evaluar el efecto de la reducción del número de YLS sobre el comportamiento alimentario de *D. kuscheli*. Para lograrlo, se aplicó la técnica DC-EPG. A través de esta metodología, se buscó encontrar información sobre la interacción entre la planta hospedera e insectos subsimbióticos.

Hipótesis y predicciones asociadas:

- H: Dada la importancia de los YLS como complemento en la nutrición del insecto, la reducción de su número afecta el comportamiento alimentario de *D. kuscheli*.
- P: La reducción del número de YLS disminuirá el suministro adicional de nutrientes aportado por los endosimbiontes, por lo que los insectos permanecerán más tiempo alimentándose del floema para cubrir sus necesidades fisiológicas.

## 4.2 Materiales y métodos

Los ensayos correspondientes a este capítulo se realizaron en dos etapas. El procedimiento para la obtención de hembras macrópteras control y subsimbióticas se desarrolló en el bioterio de la Div. Entomología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, bajo condiciones controladas de temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humedad relativa (40%-60%) y fotoperíodo (16 h luz 8 h oscuridad). El estudio del comportamiento alimentario de dichos insectos fue llevado a cabo en el Centro de Bioinvestigaciones (CeBio) con sede en Pergamino, Universidad

Nacional del Noreste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA) bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo mencionadas.

#### 4.2.1 Insectos y plantas experimentales

Ninfas de tercer estadio originarias de una misma cohorte se alimentaron sobre plantas de avena de la variedad Elizabeth aleatoriamente asignadas a un tratamiento con el fungicida PT o agua destilada como control, siguiendo el mismo protocolo detallado en el Capítulo 2, sección 2.2.4.2, para la obtención de adultos subsimbióticos y control.

Las plantas utilizadas para la evaluación del comportamiento alimentario se obtuvieron de semillas de la misma variedad de avena y fueron utilizadas en estado de tres hojas sin ser expuestas a ningún tratamiento. Tanto los insectos como las plantas fueron trasladados al CeBio y se aclimataron en el bioterio de la institución. Solo las hembras macrópteras obtenidas de ambos tratamientos (control y subsimbióticas) de 0-72 h de emergidas fueron utilizadas en el experimento.

#### 4.2.2 Registro de EPG

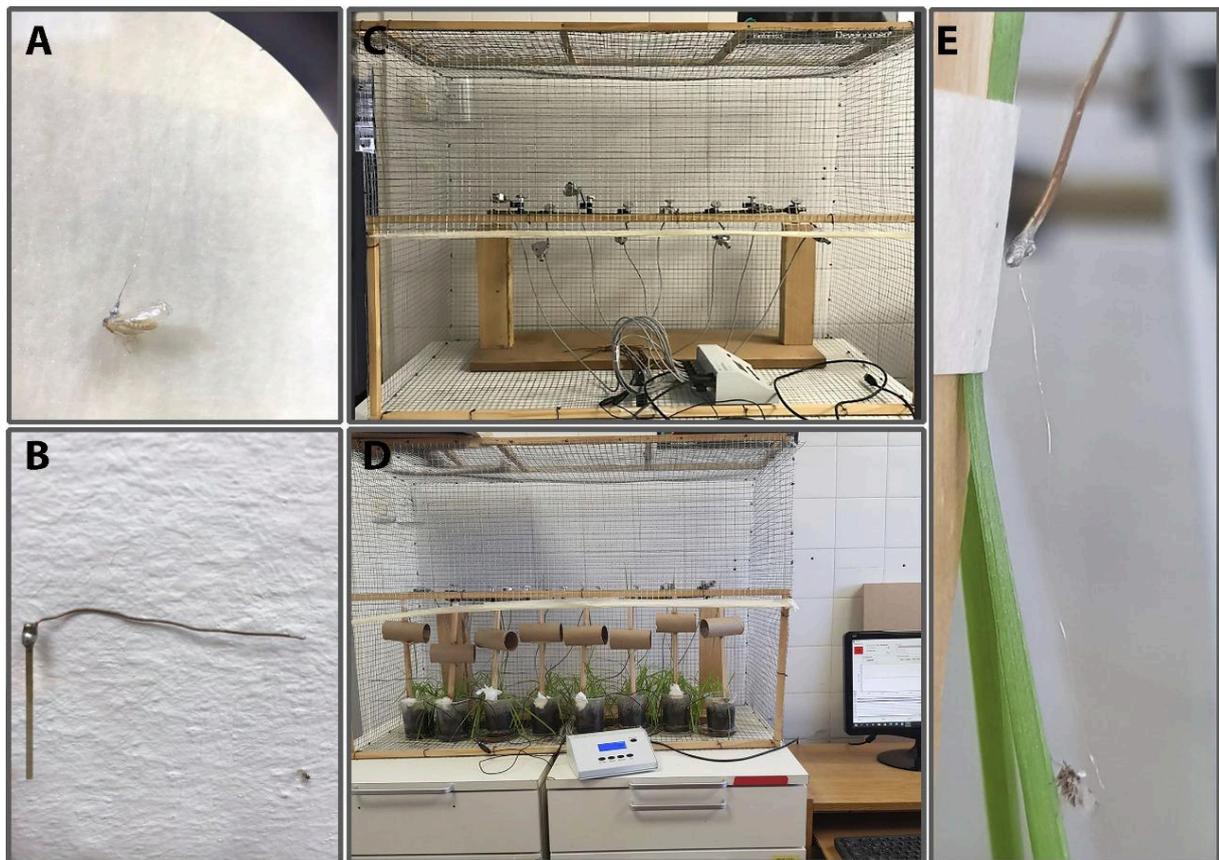
El comportamiento alimentario de hembras macrópteras de *D. kuscheli* control y subsimbióticas, evidenciado por la ocurrencia, secuencia y duración de cada evento de penetración de los estiletes en plantas de avena, se registró utilizando un dispositivo GIGA-8 DC-EPG, diseñado por Tjallingii en la Universidad de Wageningen, Holanda (**Fig. 4.2**) El equipo consta de ocho amplificadores principales, lo que permitió probar simultáneamente cuatro hembras control y cuatro subsimbióticas por cada registro/sesión de grabación de EPG. Los amplificadores se ubican dentro de una jaula de Faraday (una malla de aluminio sostenida por un marco de madera) para reducir la interferencia del ruido eléctrico externo.

Para el experimento con *D. kuscheli*, se adaptó el procedimiento seguido por Carpane y Catalano (2022) en *Dalbulus maidis* (DeLong) (Hemiptera: Cicadellidae).

Antes de cada sesión de grabación, tanto las hembras control como las subsimbióticas fueron retiradas de sus respectivas jaulas, colocadas individualmente en tubos de ensayo y anestesiadas en hielo picado aproximadamente durante 30 min. Luego, bajo microscopio estereoscópico se les pegó sobre el escutelo un hilo de oro (12,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 2- 3 cm de largo, Sigmund Cohn, Mount Vernon, NY) usando una gota de pintura de plata conductora para circuitos eléctricos. El otro extremo del hilo se pegó a un alambre de cobre (de aproximadamente 0,5 mm de diámetro y 3 cm de largo) soldado a un clavo de latón. Antes de comenzar cada registro/sesión de grabación, las hembras fueron hambreadas durante aproximadamente dos horas, tiempo requerido para el acondicionamiento de insectos y plantas. El electrodo para las plantas fue un alambre de cobre (2 mm de diámetro y 10 cm de largo) insertado en la tierra húmeda de cada maceta. Las plantas se acondicionaron y colocaron con las hojas erguidas. Este procedimiento expuso la superficie abaxial de las hojas a los insectos, ya que suele ser la preferida a la hora de iniciar la penetración de los estiletes (Brentassi y Remes Lenicov, 2006; Fereres y Moreno, 2009). Los clavos con los insectos sujetos por el hilo de oro se colocaron en los ocho amplificadores principales del equipo. Una vez que todos los insectos y plantas estuvieron en su lugar, se encendió el equipo y las macetas se movieron rápidamente para que los insectos pudieran alcanzar las hojas (una por insecto) cerrando así el circuito para dar lugar al registro del comportamiento alimentario.

La configuración inicial del equipo fue de 50% de ganancia y se ajustó independientemente para cada amplificador durante los primeros 30 min para garantizar que el voltaje de salida oscilara entre los -5 y +5 V. El tiempo de duración total de cada registro por insecto fue de 6 h, bajo luz continua, a una temperatura de 25 °C aproximadamente y humedad

relativa cercana al 70%. Los amplificadores donde se conectaron los insectos se alternaron y luego aleatorizaron entre los controles y las hembras subsimbióticas en cada sesión de registro para evitar cualquier tipo de sesgo y también se utilizaron nuevas plantas por insecto luego de cada sesión de grabación. Las ondas de EPG generadas por cada insecto se obtuvieron utilizando el *software Stylet + en su versión para Windows®* y se almacenaron en el disco duro de la computadora.



**Fig. 4.2. Pasos seguidos para el estudio del comportamiento alimentario de hembras de *D. kuscheli* subsimbióticas y control (A):** Adhesión de hilo de oro sobre el escutelo utilizando una gota de pintura de plata **(B):** Insecto adherido al hilo el cual está pegado a un alambre de cobre soldado a un clavo de latón. **(C):** Equipo de EPG dentro de una jaula de Faraday. **(D):** Cuatro hembras subsimbióticas y cuatro hembras control colocadas en cada uno de los amplificadores en contacto con una hoja de avena mientras se registran en el monitor las ondas de alimentación generadas **(E):** Detalle de *D. kuscheli* alimentándose sobre la superficie abaxial de una hoja de avena.

### 4.2.3 Formas de onda de EPG

Se utilizó el *software Stylet+a* para distinguir y anotar manualmente los eventos en los que aparecía una onda determinada y su duración. Las distintas formas de onda obtenidas en hembras control y subsimbióticas se clasificaron según Seo *et al.* (2009) para *N. lugens* y Brentassi *et al.* (2019) para *D. kuscheli*. Las mismas se caracterizaron según su forma, nivel de voltaje, amplitud y frecuencia en **np** “**no penetration**”: sin penetración de los estiletes en el tejido vegetal, se presenta como una línea horizontal plana en 0 V, **ph** “**pathway phase**” (incluye a **N1**: inicio de la penetración y a **N2**: movimiento de los estiletes y salivación extracelular), **N3**: actividad extracelular cerca del floema, **N4-a**: actividad intracelular en el tejido del floema, **N4-b**: ingestión de savia del floema y **N5**: actividad de los estiletes en el xilema (**Tabla 4.1**). Se define a una “**prueba**” como el período de tiempo en el que los insectos mantuvieron sus estiletes insertados en el tejido vegetal, visto en el dispositivo EPG como una desviación de la línea plana a 0 V. En la mayoría de las pruebas, los insectos realizan más de una actividad y cada actividad se observa como uno de los patrones de onda descritos anteriormente.

Luego de identificar y medir el tiempo de aparición de cada onda, las secuencias de ondas se guardaron en el programa *Stylet* en formato ANA. Posteriormente, los datos se procesaron utilizando el EPG-Excel Data Workbook para el cálculo automático de parámetros de datos EPG, versión 4.4.3 desarrollado por Sarria *et al.* (2009).

**Tabla 4.1.** Presuntas actividades de penetración de los estiletes de *D. kuscheli* en el tejido vegetal según las formas de onda de EPG. Modificado de Seo *et al.* (2009).

Forma de onda de EPG	Actividad de penetración de los estiletes en la planta
np	No hay penetración de los estiletes en la planta
N1	Inicio de la penetración de los estiletes en la planta
N2	Salivación y movimiento de los estiletes en el mesófilo
N3	Actividad extracelular cerca del floema, que siempre precede a N4-a
N4-a	Actividad intracelular en el floema (salivación), que siempre precede a N4-b
N4-b	Ingestión de la savia del floema
N5	Actividad de los estiletes en el xilema e ingestión de savia

#### 4.2.4 Análisis estadísticos

Se realizaron un total de 44 registros para cada tratamiento. Solo se consideraron réplicas válidas aquellas en las cuales los insectos permanecieron adheridos mediante el hilo de oro y fueron registrados por el equipo durante las 6 horas de grabación de EPG, manteniendo algún tipo de interacción con la planta de avena. Para cada tratamiento se obtuvieron 15 réplicas válidas.

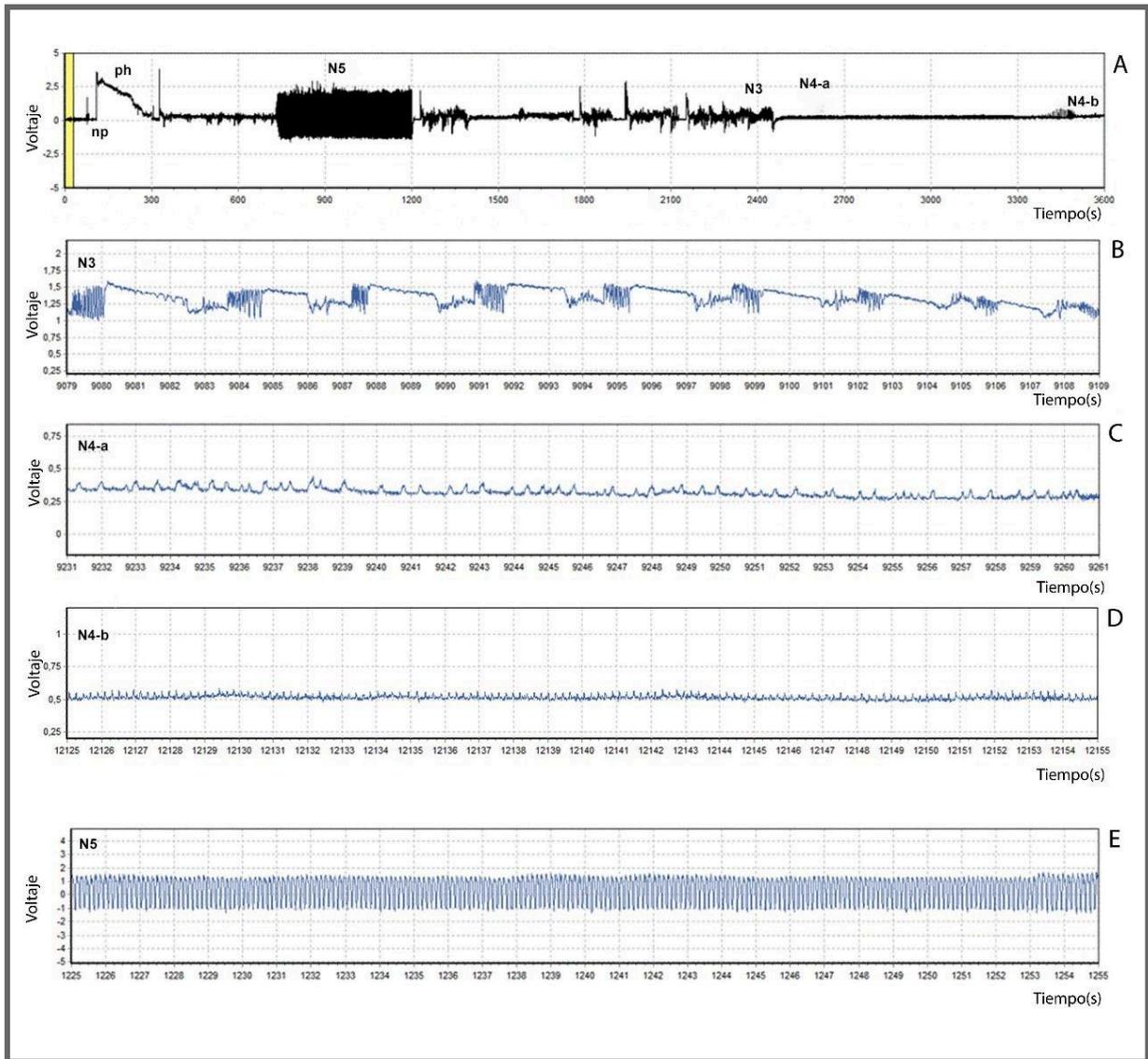
Las variables respuesta de EPG fueron caracterizadas en cinco categorías siguiendo la nomenclatura propuesta por Sarria *et al.* (2009): **(i)** “Número de”: Número total de eventos de cada actividad por insecto, entendiendo por evento a la ocurrencia ininterrumpida de una determinada forma de onda. **(ii)** “Duración total”: suma del tiempo total de los eventos de una actividad por insecto. **(iii)** “Duración media”: duración promedio por evento de una actividad por insecto. **(iv)** “Tiempo hasta”: tiempo transcurrido hasta la ocurrencia de una actividad por insecto. **(v)** “Porcentaje en”: proporción de tiempo en una actividad respecto al tiempo total de prueba.

Para el análisis de los datos registrados se ajustó un modelo lineal generalizado con distribución binomial negativa y función de enlace log en los casos en los que la variable respuesta fue el “número de eventos” y para las variables respuesta restantes se utilizó una distribución gamma y función de enlace log. En todos los casos se realizaron comparaciones de medias y la única variable explicativa categórica fue el “tratamiento”.

Los análisis se realizaron utilizando el *software* estadístico R versión 4.2.1 (R Core Team, 2022). Los modelos fueron obtenidos utilizando la función `glmmTMB` del paquete `glmmTMB` (Brooks *et al.*, 2017). Para probar los supuestos de los modelos, se utilizó el paquete `DHARMA` (Hartig, 2022). Las pruebas de hipótesis sobre los coeficientes del modelo se calcularon mediante el test de Chi-cuadrado de Wald usando el paquete `car` (Fox y Weisberg, 2019). El nivel de significancia empleado fue 0,05 y se consideraron significativas aquellas pruebas con  $P < 0,05$ . Los contrastes de Tukey y los intervalos de confianza (IC) del 95% se obtuvieron con el paquete `emmeans` (Lenth *et al.*, 2020).

### 4.3 Resultados

Luego de analizar las diferentes ondas obtenidas en un periodo de 6 h (360 min) (**Fig. 4.3**), las hembras de *D. kuscheli* control y subsimbióticas mostraron diferencias significativas en algunas características estudiadas de su comportamiento alimentario.



**Fig. 4.3. Formas de onda de EPG registradas para *D. kuscheli*.** (A) Ejemplo de la visualización completa de una hora (3600 s) desde el inicio del registro. Se observan las seis ondas de alimentación identificadas. El eje Y (-5 a +5 voltios) representa el voltaje de salida. (B-E) Detalle de las principales ondas de alimentación. (B) **N3**: Actividad extracelular cerca del floema, que siempre precede a N4-a. (C) **N4-a**: Actividad intracelular en el floema (salivación), que siempre precede a N4-b. (D) **N4-b**: Ingestión de la savia del floema. (E) **N5**: Actividad de los estiletes en el xilema e ingestión de savia. np: no hay penetración de los estiletes. np= Sin penetración de los estiletes en la planta, **ph**: “pathway phase” (incluye a **N1**: inicio de la penetración y a **N2**: movimiento de los estiletes y salivación extracelular).

En la **Tabla 4.2** se presenta un resumen de las variables analizadas. Se observó que las hembras control realizaron la primera prueba desde el inicio del registro de EPG en un tiempo promedio de 2,02 min (IC 95% 0,97 – 4,18 min). En contraste, las hembras subsimbióticas mostraron un retraso significativo, con un tiempo promedio de inicio de 16,96 min (IC 95% 8,188 – 35,15 min). Además, la duración de esta primera prueba fue significativamente más larga en el grupo control, en promedio de 19,80 min (IC 95% 9,79 - 40,0 min) en comparación a las hembras subsimbióticas, que fue de 5,78 min (IC 95% 2,86 – 11,7 min).

A su vez, se encontraron diferencias significativas en el tiempo y el número de pruebas necesarias para alcanzar la onda N4-a. Esta onda se relaciona con la actividad intracelular en el floema y consiste en la actividad de salivación del insecto. Las hembras subsimbióticas demoraron más tiempo desde el inicio del EPG y desde la primera prueba hasta realizar la primera onda N4-a y realizaron un mayor número de pruebas hasta lograr esta onda. Asimismo, presentaron un periodo de no penetración más prolongado en comparación al de las hembras control antes de la primera N4-a. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de ondas, la duración promedio y la duración total de N4-a entre los tratamientos. Tampoco hubo diferencias significativas en el porcentaje de tiempo de prueba dedicado a la actividad intracelular en el floema (onda N4-a) respecto al control.

En lo que respecta a la ingestión del floema, que refleja el momento en el que el insecto se alimenta activamente y se correlaciona con el patrón de onda N4-b, se observaron diferencias entre los tratamientos. Las hembras control lograron en promedio la ingestión de floema significativamente más rápido, a los 100,18 min (IC 95% 80,2 – 125 min) desde el inicio del EPG, mientras que las subsimbióticas demoraron en promedio 202,72 min (IC 95 % 162,2 – 253 min) hasta lograr alimentarse. Una hembra subsimbiótica, si bien registró actividades de salivación, nunca llegó a alimentarse activamente. Asimismo, las hembras control en

promedio lograron la ingestión del floema a los 98,16 min desde la primera prueba (IC 95% 76,5 – 126 min) mientras que las hembras subsimbióticas lo hicieron a los 185,75 min (IC 95% 144,7 – 238 min). Además, las hembras control lograron la primera ingestión sostenida en el floema (mayor a 10 min) en un tiempo significativamente menor desde el inicio del EPG y desde la primera prueba en comparación a las hembras subsimbióticas. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el número de ondas N4-b, ni en el número de ondas de N4-b que superaron los 10 min de duración. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la duración total de la ingestión en el floema, con un promedio de 180,96 min para las hembras control (IC 95% 123,5 – 265 min) y de 106,30 min para las subsimbióticas (IC 95% 72,5 – 156 min), lo que representó el 52,6% del tiempo total de prueba dedicado a la ingestión en el floema para las hembras control (IC 95% 37,4 – 74 %) y el 34,6% para las hembras subsimbióticas (IC 95% 24,6 - 48,6%).

De los 360 min de registro de EPG, la duración total de la actividad en el floema (ondas N4-a + N4-b) fue significativamente mayor en las hembras control, con un promedio de 224 min (IC 95% 170 – 295 min) en comparación con las subsimbióticas, que registraron un promedio de 155 min (IC 95% 117 – 203 min).

En relación al tiempo total de prueba, es decir, el tiempo en el que los insectos permanecieron con los estiletes insertados en el tejido vegetal realizando las distintas ondas, se observó que fue significativamente mayor para el control, con un promedio de 340 min (IC 95% 310 -374 min), en comparación con las hembras subsimbióticas, cuyo tiempo promedio fue de 289 min (IC 95% 263 – 318 min). La duración media y la duración total sin inserción de estiletes en el tejido vegetal, que corresponde al tiempo de no penetración, fue significativamente mayor en las hembras subsimbióticas. No se observaron diferencias entre los tratamientos en el número total de pruebas a lo largo del registro. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el número, duración promedio y duración total de la fase

identificada como "ph," que involucra las ondas generadas por la primera penetración de los estiletes y sus movimientos en el mesófilo (N1 y N2). Además, no hubo diferencias significativas en el número, duración total y duración promedio de la actividad extracelular cerca del floema, asociada al patrón de onda N3, ni en la duración promedio, duración total o número de ondas registradas en el xilema, asociado con la onda N5 (**Tabla 4.2**).

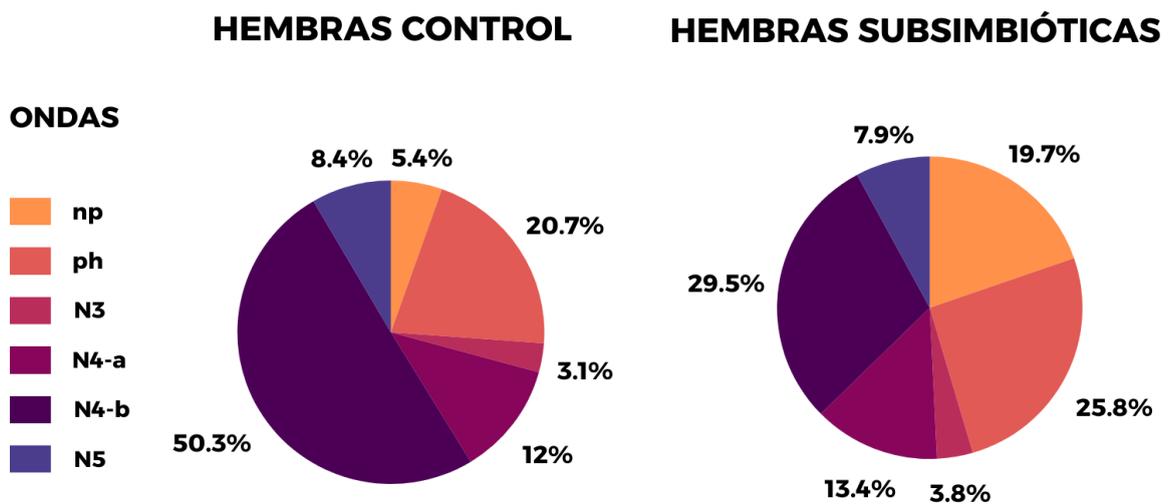
**Tabla 4.2.** Variables analizadas del comportamiento alimentario obtenidas de *EPG-Excel Data Workbook* desarrollado por Sarria et al. (2009), para las hembras de *D. kuscheli* control y subsimbióticas. Se muestran las unidades de la variable, la media, el error estándar de la media, los intervalos de confianza 95%,  $\chi^2$  y  $P > 0,05=$  ns;  $\cdot$  = marginalmente significativa; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ . **np**= Sin penetración de los estiletes en la planta, **ph** = Inicio de la penetración de los estiletes y salivación y movimiento de los estiletes en el mesófilo, **N3**= Actividad extracelular cerca del floema, **N4-a**= Actividad intracelular en el floema (salivación), **N4-b**= Ingestión de savia del floema, **N5**= Actividad de los estiletes en el xilema e ingestión de savia.

Variable respuesta	Unidad	Hembras control (n=15)		Hembras subsimbióticas (n=15)		$\chi^2$	P
		Media	IC 95%	Media	IC 95%		
Tiempo desde el inicio de EPG hasta la primera prueba	min	<b>2,02</b>	0,97 - 4,18	<b>16,96</b>	8,19 - 35,15	18,00	< 0,001***
Número de pruebas hasta la primera N4-a	#	<b>5,33</b>	3,86 - 7,38	<b>8,87</b>	6,63 - 11,85	5,75	0,0165 *
Duración primera prueba	min	<b>19,8</b>	9,79 - 40,0	<b>5,78</b>	2,86 - 11,7	6,42	0,01128 *
Duración de np antes de la primera N4-a	min	<b>5,66</b>	3,12 - 10,3	<b>54,11</b>	29,80 - 98,3	30,13	< 0,001***

Tiempo desde el inicio de EPG hasta la primera N4-a	min	<b>58,9</b>	42,8 - 81	<b>121,8</b>	88,5 - 167	10,95	< 0,001***
Tiempo desde la primera prueba hasta la primera N4-a	min	<b>56,9</b>	40,6 - 79,6	<b>104,8</b>	74,9 - 146,7	6,95	0,0084 **
Número de ondas N5	#	<b>3,13</b>	2,25 - 4,37	<b>4</b>	2,96 - 5,41	1,24	0,2652
Duración total N5	min	<b>30,4</b>	21,5 - 42,9	<b>28,3</b>	20,0 - 40,1	0,08	0,7734
Duración media N5	min	<b>9,86</b>	7,76 - 12,5	<b>8,03</b>	6,32 - 10,2	1,55	0,2134
Número de ondas N4-a	#	<b>11,27</b>	7,59 - 16,7	<b>9,67</b>	6,47 - 14,4	0,31	0,5768
Número de ondas N4-b	#	<b>1,93</b>	1,32 - 2,83	<b>1,47</b>	0,94 - 2,27	0,95	0,3285
Número de ondas N4-b mayores a 10 min	#	<b>1,53</b>	1,00 - 2,35	<b>1,33</b>	0,84 - 2,11	0,21	0,6476
Contribución de N4-a a la fase floemática %	%	<b>24,7</b>	17,4 - 35,0	<b>39,3</b>	27,7 - 55,8	3,69	0,05463 .
Duración total fase floemática (N4-a + N4-b)	min	<b>224</b>	170 - 295	<b>155</b>	117 - 203	3,88	0,04895 *
Duración total N4-a	min	<b>43,4</b>	33,0 - 57,0	<b>48,3</b>	36,8 - 63,5	0,33	0,5654
Duración total N4-b	min	<b>181</b>	123,5 - 265	<b>106</b>	72,5 - 156	4,08	0,04345 *
Duración media N4-a	min	<b>5,56</b>	4,09 - 7,55	<b>7,24</b>	5,33 - 9,83	1,58	0,2093
Duración media N4-b	min	<b>115</b>	74,5 - 178	<b>79</b>	51,1 - 122	1,58	0,2089
Número de pruebas a lo largo de todo el registro	#	<b>15,9</b>	12,6 - 20,2	<b>20,6</b>	16,4 - 25,9	2,57	0,109
Número de ph (ondas N1 + N2)	#	<b>29,2</b>	22,6 - 37,8	<b>33,5</b>	25,9 - 43,2	0,60	0,4394

Número de pruebas ph cortas menores de 3 min	#	<b>7,07</b>	4,7 - 10,6	<b>9,93</b>	6,7 - 14,7	1,52	0,2174
Número de np	#	<b>16</b>	12,6 - 20,2	<b>20,7</b>	16,5 - 25,9	2,58	0,1082
Número de ondas N3	#	<b>11,3</b>	7,46 - 17,0	<b>10</b>	6,59 - 15,2	0,17	0,6764
Duración total de ph	min	<b>74,7</b>	57,6 - 97	<b>92,8</b>	71,5 - 120	1,45	0,2282
Duración total N3	min	<b>11,3</b>	6,87 - 18,7	<b>13,5</b>	8,19 - 22,3	0,26	0,6091
Duración total de la fase no floemática	min	<b>136</b>	105 - 175	<b>205</b>	159 - 265	5,57	0,01824 *
Duración total de np	min	<b>19,6</b>	12,6 - 30,6	<b>70,8</b>	45,4 - 110,5	17,54	< 0,001***
Tiempo total de prueba	min	<b>340</b>	310 - 374	<b>289</b>	263 - 318	6,27	0,01226 *
Duración media np	min	<b>1,2</b>	0,76 - 1,88	<b>4,38</b>	2,79 - 6,87	17,44	< 0,001***
Duración media ph	min	<b>2,84</b>	2,25 - 3,60	<b>3,05</b>	2,41 - 3,86	0,18	0,6696
Tiempo desde inicio de EPG hasta N4-b mayor a 10 min	min	<b>109</b>	87,5 - 135	<b>191</b>	153,1 - 239	14,07	< 0,001***
Tiempo desde primera prueba hasta N4-b mayor a 10 min	min	<b>107</b>	83,7 - 136	<b>173</b>	135,0 - 223	8,24	0,0041 **
Tiempo desde el inicio de EPG hasta primera N4-b	min	<b>100</b>	80,2 - 125	<b>203</b>	162,2 - 253	21,04	< 0,001***
Tiempo desde la primera prueba hasta la primera N4-b	min	<b>98,2</b>	76,5 - 126	<b>185,8</b>	144,7 - 238	13,75	< 0,001***
Duración N4-b más larga	min	<b>152</b>	110,6 - 209	<b>103</b>	73,9 - 143	3,10	0,07847 .
% de pruebas en ph	%	<b>22,3</b>	17,2 - 29,0	<b>32,7</b>	25,1 - 42,4	4,47	0,03456 *

% de pruebas en N4-a	%	<b>12,8</b>	9,93 - 16,5	<b>16,5</b>	12,81 - 21,3	2,11	0,1464
% de pruebas en N4-b	%	<b>52,6</b>	37,4 - 74,0	<b>34,6</b>	24,6 - 48,6	3,18	0,07462
% de pruebas en N5	%	<b>9,01</b>	6,05 - 13,4	<b>11,75</b>	7,89 - 17,5	0,93	0,3338
% de pruebas de N4-b mayor a 10 min	%	<b>85</b>	63,5 - 114	<b>87,8</b>	65,6 - 118	0,03	0,8701



**Fig. 4.4. Proporción del tiempo total de actividades que las hembras control y subsimbóticas realizaron en los 360 min de registro de EPG.** np= Sin penetración de los estiletes en la planta, ph= Inicio de la penetración de los estiletes y salivación y movimiento de los estiletes en el mesófilo, N3= Actividad extracelular cerca del floema, N4-a= Actividad intracelular en el floema (salivación), N4-b= Ingestión de savia del floema, N5= Actividad de los estiletes en el xilema e ingestión de savia.

#### 4.4 Discusión

Los insectos picadores succionadores del orden Hemiptera que se especializan en consumir la savia de las plantas hospedadoras, dependen en gran medida de los endosimbiontes nutricionales para proporcionar los aminoácidos y esteroides faltantes en sus dietas (Buchner, 1965; Douglas,

2009). Debido a la importancia de estos microorganismos para complementar la nutrición del insecto hospedero, en este capítulo se exploraron los cambios en el comportamiento alimentario de hembras subsimbióticas de *D. kuscheli*.

Se esperaba que las hembras subsimbióticas permanecieran mayor cantidad de tiempo alimentándose del floema para compensar la falta de nutrientes aportados por los YLS. Este tipo de comportamiento de compensación alimentaria, fue reportado por Li *et al.* (2019) en las chicharritas *Sogatella furcifera* cuando se las privó de su endosimbionte bacteriano facultativo *Asaia* sp a través de antibióticos. Los investigadores encontraron que las hembras aposimbióticas se alimentaron comparativamente más que las hembras control, reflejado por la mayor cantidad de melaza excretada, aunque el peso de las hembras control fue mayor. Contrariamente a lo esperado, los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que las hembras subsimbióticas de *D. kuscheli* permanecieron menos tiempo ingiriendo savia del floema. Como se mencionó anteriormente, el comportamiento alimentario inicial de los insectos picadores suctores en una planta hospedera involucra el reconocimiento de la planta en búsqueda de los sitios apropiados para insertar los estiletes. En este contexto, la “no penetración” es considerada un comportamiento alimentario indicativo de la búsqueda de sitios de prueba antes de la inserción de los estiletes en el tejido vegetal (Backus 1985; Gao *et al.*, 2022). Aquí, se observó que en el periodo registrado de 6 h (360 min), las hembras subsimbióticas demoraron más tiempo en realizar la primera inserción de los estiletes en el tejido vegetal. A su vez, también realizaron un mayor número de ondas hasta localizar el floema y se retrasó el tiempo desde el inicio del EPG y desde la primera prueba hasta la primera ingestión de savia floemática. Además, las hembras subsimbióticas mostraron una duración total y una duración media de no penetración mayor que las hembras control. En consecuencia, la duración total de la fase no floemática fue más duradera para las hembras subsimbióticas,

presentando una reducción en el tiempo total de ingestión en el floema en comparación al control. Por lo tanto, la disminución del tiempo de ingestión de savia floemática en las hembras subsimbióticas, parece deberse principalmente al periodo prolongado en el que las mismas permanecieron sin insertar los estiletes en el tejido vegetal, sumado a que en el tiempo en el que sí realizaron pruebas, un alto porcentaje de las mismas fue dedicado al movimiento de los estiletes en el mesófilo, fase descrita como ph. Tanto las hembras control como las subsimbióticas dedicaron un tiempo similar a la ingestión de savia xilemática. Como ya se ha considerado (Brentassi *et al.*, 2019; Carpane y Catalano, 2022), esto podría deberse a la necesidad de los insectos de rehidratarse después de un período de hambreado de aproximadamente dos horas, antes del inicio de las sesiones de registro de EPG.

El comportamiento alimentario en delfácidos cuyos endosimbiontes nutricionales, los YLS, se encuentren reducidos, no ha sido estudiado en detalle (Zhang *et al.*, 2015b). Sin embargo, se cuenta con varias investigaciones en otros hemípteros alimentadores del floema y sobre el efecto de la eliminación de distintos endosimbiontes bacterianos en su comportamiento alimentario (Angelella *et al.*, 2018; Leybourne *et al.*, 2020; Ying *et al.*, 2021). Particularmente, es interesante mencionar los trabajos realizados en áfidos y su endosimbionte nutricional *Buchnera aphidicola* (Wilkinson y Douglas, 1995; Machado Assefh *et al.*, 2015; Machado Assefh y Alvarez, 2016). Si bien los YLS y *B. aphidicola* difieren filogenéticamente, ambos endosimbiontes mejoran la calidad nutricional de la dieta de sus hospederos, entre otras razones, por el aporte de aminoácidos. En un estudio comparativo entre un sistema formado por un delfácido y sus YLS, y un áfido y *B. aphidicola*, Wilkinson e Ishikawa (2001) concluyeron que los ajustes metabólicos de los insectos ante la pérdida de sus endosimbiontes son equivalentes. Por lo tanto, podría ser relevante comparar los resultados obtenidos en esta tesis y los obtenidos por otros investigadores para el sistema áfido- *B. aphidicola*. Machado Assefh *et al.* (2015) encontraron que

en *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae), la eliminación de *B. aphidicola* mediante el uso de antibióticos provocó que los áfidos retrasen la aceptación a la planta hospedera, mostrando un período de no penetración prolongado junto con un retraso en el tiempo de ingestión del floema, mismos resultados obtenidos en esta tesis para las hembras de *D. kuscheli* subsimbióticas. En su trabajo, Machado Assefh *et al.* (2015) plantearon la posibilidad de que este endosimbionte podría desempeñar un papel importante a nivel de la regulación de las proteínas salivales del insecto, interviniendo en la interacción planta-áfido. Para lograr la inserción de los estiletes en el tejido vegetal, *D. kuscheli* secreta saliva coagulable que forma un revestimiento tubular a lo largo del recorrido realizado por los estiletes (Brentassi y Remes Lenicov, 2007). Esta estructura se denomina "vaina de estilete o vaina salival" y juega un papel importante en la agrupación de los estiletes permitiéndoles funcionar como un órgano eficiente de perforación y succión (Miles, 1972; Sōgawa, 1982). Como se mencionó anteriormente, esta vaina del estilete está compuesta principalmente de material lipoproteico. Los YLS están precisamente implicados en el aporte de aminoácidos y lípidos (Xue *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2015), por lo que sería interesante ahondar el estudio desde una perspectiva ecofisiológica y molecular para dilucidar si los YLS podrían llegar a intervenir en la interacción entre *D. kuscheli* y su hospedante preferencial, la avena.

La dificultad y retraso de las hembras subsimbióticas en lograr una alimentación exitosa, sumado a la disminución del aporte de nutrientes por parte de los YLS, podría ser otro de los factores que explique el bajo peso resultante respecto a las hembras control y parte de los problemas fisiológicos reportados en los experimentos mostrados anteriormente en el capítulo 3. A su vez, sería pertinente investigar si este mismo comportamiento de retraso en la inserción de los estiletes y la demora en la localización e ingestión del floema, se observa desde el estado ninfal cuando ya se hace efectiva la reducción de YLS (al quinto día que ninfas de

tercer estadio inician su alimentación en las plantas tratadas con el fungicida PT). Dado que las demandas dietéticas de los insectos cambian a lo largo de su desarrollo para cumplir con las necesidades de crecimiento (Skidmore y Hansen, 2017), y considerando la reducción en el número de YLS en un momento crítico de crecimiento, es posible que la alimentación se vea alterada de acuerdo con la etapa de desarrollo del insecto.

Un aspecto a tener en cuenta es que *D. kuscheli* también se encuentra interactuando con otros endosimbiontes de tipo bacteriano que no fueron el foco de esta tesis ni el blanco del tratamiento utilizado para la reducción de YLS, pero que pudieron haber sido afectados por el fungicida sistémico PT al igual que alguna ruta metabólica propia del insecto. En este sentido, la posible alteración causada por el tratamiento con el fungicida sistémico en alguna de estas cuestiones pudo ser parte de la modificación en el comportamiento alimentario de las hembras subsimbióticas.

En conclusión, el periodo prolongado de no penetración de los estiletes en el tejido vegetal, la demora en acceder al floema y la disminución en el tiempo total dedicado a la ingestión de la savia floemática en las hembras subsimbióticas, subrayan la relevancia de explorar en profundidad las interacciones entre los YLS, *D. kuscheli* y sus plantas hospedadas. Futuras investigaciones podrían estar dirigidas a evaluar la interacción de *D. kuscheli* con otro hospedante como el maíz y si de alguna manera la reducción en el número de YLS afecta su capacidad de actuar como vector del virus del Mal de Río Cuarto. La comprensión de estos sistemas complejos contribuye no sólo al conocimiento de la biología de *D. kuscheli* sino también a la generación de información relevante para incluir dentro del manejo integrado de esta plaga.

# CAPÍTULO 5

Efecto de la reducción del número de YLS de *Delphacodes kuscheli* sobre la capacidad biocida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*



## 5.1 Introducción

Las interacciones mutualistas entre simbioses e insectos son comunes y generan una amplia diversidad de alianzas (Bennett y Moran, 2015; Douglas, 2015; Mondal *et al.*, 2023). La incorporación de un microorganismo con nuevas vías metabólicas, puede conferir de inmediato un conjunto de rasgos novedosos para el hospedero (Feldhaar, 2011; Sudakaran *et al.*, 2017). Las relaciones mutualistas que establecen la gran mayoría de los Hemiptera con bacterias y hongos suelen ser obligadas tanto para los insectos como para los endosimbioses, los cuales son transmitidos verticalmente a la siguiente generación y se encuentran universalmente presentes en todos los individuos de la especie hospedera (Moran *et al.*, 2008). La principal función reconocida de los **endosimbioses obligados** es la de aportar los nutrientes faltantes o que se encuentran en niveles subóptimos en la dieta de sus hospederos. Por lo tanto, se los suele caracterizar en conjunto como **simbioses nutricionales** (Douglas, 2009). Tanto los endosimbioses como los hospederos muestran interdependencia y complementariedad metabólica, por lo que representan uno de los mutualismos más extremos conocidos. Por otro lado, se encuentran simbioses que abarcan una gama más amplia de taxones microbianos y que forman asociaciones de tipo facultativas con la mayoría de los grupos de insectos (Moran *et al.*, 2008; Cornwallis *et al.*, 2022). Los **simbioses facultativos** no suelen ser esenciales para la supervivencia y reproducción del hospedero. Generalmente, residen sólo en una fracción de los individuos de una especie y se transfieren tanto verticalmente, con alta o moderada frecuencia, como horizontalmente. Las relaciones de los simbioses facultativos con sus hospederos abarcan desde la patogenicidad hasta el comensalismo o el mutualismo (Moran *et al.*, 2008; Ferrari y Vavre, 2011). Dentro de los beneficios que los simbioses facultativos les pueden conferir a sus hospederos, se mencionan la tolerancia térmica (Montllor *et al.*, 2002; Russell y Moran, 2006), la

desintoxicación de compuestos nocivos como fitotoxinas o pesticidas presentes en las plantas de las que los insectos se alimentan (van den Bosch y Welte, 2017), el aporte de ciertos aminoácidos (Li *et al.*, 2019) y la **defensa** contra enemigos naturales como patógenos (bacterias, hongos y virus), parásitos, parasitoides o depredadores (Clay, 2014; Gerardo y Parker, 2014; Vorburger y Perlman, 2018).

Ante las amenazas a las que se encuentran frecuentemente expuestos, los insectos muestran adaptaciones que incluyen defensas conductuales, mecánicas, estructurales, y el desarrollo de un sistema inmunitario (Flórez *et al.*, 2015; Lu y Leger, 2016). A su vez, se reconoce en distintos grupos taxonómicos de insectos, la participación de microorganismos simbiotes implicados en la defensa de su hospedero. En las **simbiosis defensivas**, los hospederos exhiben una mayor aptitud que los individuos libres de simbiotes en presencia de enemigos naturales (Clay, 2014). Aunque la producción de compuestos bioactivos (realizada casi exclusivamente por simbiotes facultativos bacterianos) se toma como criterio para la categorización de un mutualismo defensivo (Cornwallis *et al.*, 2022), existen otras formas en las que los microorganismos pueden contribuir a la protección de sus hospederos contra distintos antagonistas. Flórez *et al.* (2015) las detallaron de la siguiente manera: **(i)** Los simbiotes pueden excluir competitivamente a otros microorganismos patógenos. **(ii)** La interacción con simbiotes puede estimular o preparar el sistema inmunitario del hospedero y mejorar así la resistencia contra patógenos. **(iii)** Los simbiotes pueden producir compuestos bioactivos o sus precursores y contribuir de esta manera a la química defensiva del hospedero. **(iv)** Los simbiotes pueden potenciar el bienestar general del hospedero, permitiéndole destinar más recursos a la defensa. Este último caso representa a los endosimbiotes nutricionales. Particularmente, los simbiotes nutricionales han sido poco explorados en el contexto de las simbiosis defensivas (Nakabachi *et al.*, 2013; Kanyile *et al.*, 2022) y hasta la fecha, no se han llevado a cabo investigaciones específicas

sobre la posible implicancia de endosimbiontes fúngicos nutricionales en la defensa de su hospedero.

Los hongos entomopatógenos desempeñan un rol ecológico como enemigos naturales de los Hemiptera, orden que abarca numerosas especies, incluidas aquellas que representan importantes plagas de la agricultura (Steinkraus, 2007; Toledo y Manfrino, 2019). *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Clavicipitaceae) es uno de los hongos entomopatógenos mayormente utilizados para el control de plagas a nivel mundial, debido entre otras características a su amplio rango de hospederos, fácil multiplicación masiva y aplicación, y compatibilidad con ciertos fungicidas y enemigos naturales de las plagas (Jacobson *et al.*, 2001; de Faria y Wraight *et al.*, 2007).

La primera línea de defensa de los insectos frente a un hongo entomopatógeno es la cutícula, una barrera física contra la infección compuesta principalmente por fibrillas de quitina envueltas en cadenas de proteínas ricas en aminoácidos aromáticos (Moussian, 2010; Kiefer *et al.*, 2021). Además, los insectos modifican la cutícula nativa mediante la integración de compuestos fenólicos derivados de la tirosina en dos procesos llamados esclerotización y melanización, que conducen a una cutícula más dura y más oscura. Dichos procesos comparten enzimas con ciertos mecanismos de defensa inmune de los insectos (Siva-Jothy *et al.*, 2005; Feldhaar y Gross, 2008). Al entrar en contacto con la cutícula, los conidios de *B. bassiana* se adhieren, germinan y penetran el tegumento, las blastosporas proliferan en la hemolinfa, lo que concluye con la muerte del insecto por obstrucción de todos sus sistemas, agotamiento de nutrientes y en algunos casos por liberación de toxinas. Posteriormente, el hongo vuelve a atravesar la cutícula desde el hemocele y forma conidios infecciosos que se liberan al ambiente para su transmisión a nuevos hospederos (Mascarín y Jaronski, 2016).

En nuestro país se evaluó la patogenicidad y virulencia de ciertos aislados de *B. bassiana* en condiciones de laboratorio frente a la chicharrita

*D. kuscheli*, principal vector del MRCV, demostrando una alta efectividad, con porcentajes de mortalidad acumulada mayores al 70% (Toledo *et al.*, 2007). Si bien se ha informado que bacterias facultativas del género *Bacillus* aisladas de la superficie cuticular de *D. kuscheli* tuvieron un efecto antagónico sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *B. bassiana* (Toledo *et al.*, 2011), aún se desconoce el posible papel que los YLS, los endosimbiontes nutricionales fúngicos de *D. kuscheli*, podrían desempeñar en la defensa de la chicharrita frente a este entomopatógeno.

**En este capítulo de tesis se aborda el cuarto objetivo propuesto:** evaluar el efecto de la reducción del número de YLS de *D. kuscheli* sobre la capacidad biocida de *B. bassiana*. Para esto se propuso en primer término encontrar un fungicida compatible con dos aislados de *B. bassiana* (CEP147 y CEP002) que a su vez redujera el número de YLS del insecto. En búsqueda de dicho fungicida, se testearon los fungicidas utilizados en el Capítulo 2, sección 2.2.4.2 para la obtención de insectos subsimbióticos, mediante pruebas de antibiograma. Luego, se realizaron ensayos de patogenicidad y virulencia *in vivo* aplicando la suspensión de conidios de ambos aislados fúngicos en insectos con carga natural de YLS y subsimbióticos, registrando diariamente la mortalidad de los insectos durante siete días. A través de los ensayos se buscó comprender el papel que desempeñan los YLS en la resistencia de *D. kuscheli* frente a una infección fúngica. A partir de los resultados obtenidos se espera ofrecer perspectivas novedosas para el estudio de estas interacciones tripartitas.

**Hipótesis y predicciones asociadas:**

- H: La reducción del número de YLS provoca un desbalance nutricional en *D. kuscheli*, lo que impacta en la conformación de su cutícula, por lo que resultan más susceptibles al ataque de *B. bassiana*.

- P: La reducción del número de YLS disminuirá la probabilidad de supervivencia y el tiempo necesario para causar la mortalidad de insectos subsimbióticos expuestos a *B. bassiana*.

## 5.2 Materiales y métodos

Los ensayos correspondientes a este capítulo se desarrollaron en dos instituciones. La obtención de insectos subsimbióticos se realizó en el bioterio de la Div. de Entomología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, bajo condiciones controladas de temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humedad relativa (40%-60%) y fotoperiodo (16 h luz 8 h oscuridad). Los ensayos que involucraron al hongo entomopatógeno *B. bassiana* se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones en Fitopatologías (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF), UNLP.

### 5.2.1 Aislados de *Beauveria bassiana* CEP147 y CEP002

Los aislados fúngicos fueron obtenidos e identificados por la doctora Toledo (2006). El aislado *B. bassiana* CEP147 se obtuvo a partir de un ejemplar adulto de *Cycloneda sanguinea* L. (Coleoptera: Coccinellidae) sobre un cultivo de *Zea mays* en la provincia de Tucumán en el año 2004. En cambio, el aislado *B. bassiana* CEP002 se obtuvo de una muestra de suelo en cultivos de *Z. mays* en la provincia de Buenos Aires en el año 2003. Con relación a la virulencia, ambos aislados fúngicos fueron evaluados contra el delfácido *Peregrinus maidis* (Ashmead). El aislado *B. bassiana* CEP 147 resultó más virulento que el aislado *B. bassiana* CEP 002, ocasionando mortalidades de 69,8% y 32,6% a los 7 días, respectivamente (Toledo *et al.*, 2007). Ambos aislados fueron depositados en la Colección Micológica del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) y actualmente se encuentran también preservados en el CIDEFI, FCAyF- UNLP.

### 5.2.2.1 Selección de fungicidas compatibles con el desarrollo de los aislados *B. bassiana* CEP147 y CEP002

El antibiograma es una prueba *in vitro* de sensibilidad por difusión en agar esencialmente cualitativa que consiste en colocar un disco de papel de filtro cargado con un antimicrobiano en una placa en la que previamente se ha inoculado un microorganismo objeto de estudio. De esta manera, permite determinar si el microorganismo es sensible o resistente, es decir, si el antimicrobiano inhibe o no el crecimiento del microorganismo ensayado (Prescott, 2002). Aquí, se testearon mediante este método los seis fungicidas utilizados para reducir el número de YLS en *D. kuscheli* detallados en el Capítulo 2, sección 2.2.4.2, con la finalidad de evaluar su compatibilidad con los dos aislados de *B. bassiana*: CEP147 y CEP002. A continuación, se detalla el protocolo de diseño para la conformación de las unidades experimentales:

**Preparación del inóculo:** Los aislados fúngicos se incubaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo medio Sabourad dextrosa agar enriquecido con 0.25 % de extracto de levaduras (SDAY1/4), durante 10 días a 26 °C y en oscuridad. A partir del micelio, se cosecharon los conidios con el uso de una espátula metálica y se suspendieron en Tween 20 0,01% v/v. En cámara de Neubauer se cuantificaron los conidios de la suspensión y la misma se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml.

**Preparación del medio de cultivo:** En placas de Petri de 90 mm de diámetro se colocaron 25 ml de SDAY1/4. Se realizaron tres réplicas por fungicida y por aislado fúngico (18 placas por cada aislado fúngico, 36 placas totales). Cada una de las placas conteniendo el medio de cultivo fue inoculada con 100  $\mu$ l de la suspensión de conidios preparada previamente que fue dispersada homogéneamente usando una espátula de Drigalsky.

**Dilución de los fungicidas:** La concentración de cada uno de los fungicidas protioconazol (**P**), protioconazol y trifloxistrobin (**PT**), piraclostrobin y epoxiconazol (**PE**), piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad (**PEF**), picoxistrobin y ciproconazol (**PC**), tebuconazol (**T**), se ajustó a 0,1%, concentración utilizada anteriormente en los ensayos de reducción del número de YLS de *D. kuscheli*.

**Discos de antibiograma:** Un vez obtenida la concentración deseada, con una micropipeta se aplicaron 25 µl de los distintos fungicidas sobre cada uno de los disco en blanco (sin carga antimicrobiana) de 6 mm de diámetro (Oxoid Ltd., Reino Unido) dispuestos previamente sobre placas de Petri de vidrio estéril. Mediante el uso de una pinza esterilizada se colocaron 3 discos en cada una de las placas sembradas con la suspensión de conidios de cada aislado de *B. bassiana*.

**Incubación y mediciones:** Las placas se incubaron a 26 °C en oscuridad por un período de 5 días, al cabo de los cuales se estimó la inhibición del crecimiento micelial, promediando los valores de dos medidas diametralmente opuestas en cada halo de inhibición. Las medidas se tomaron con el uso de un calibre electrónico digital.

#### 5.2.2.2 Análisis estadístico

Se ajustó un modelo lineal general mixto de distribución normal. Se modeló el diámetro del halo (mm) como variable respuesta y la interacción entre las variables explicativas “fungicida” y “aislado”, ambas categóricas y fijas, y se incluyó la variable “réplica” como aleatoria. Se llevó a cabo una comparación de medias para evaluar las diferencias en el tamaño del halo de inhibición del crecimiento micelial generado por los distintos fungicidas en cada aislado fúngico. Los análisis se realizaron utilizando el *software* estadístico R versión 4.2.1 (R Core Team, 2022). El modelo se realizó utilizando la función `glmmTMB` del paquete `glmmTMB` (Brooks *et al.*, 2017). Para probar los supuestos del modelo, se utilizó el paquete `DHARMA`

(Hartig, 2022). Las pruebas de hipótesis sobre los coeficientes del modelo se calcularon mediante el test de Chi-cuadrado de Wald usando el paquete car (Fox y Weisberg, 2019). El nivel de significancia empleado fue 0,05 y se consideraron significativas aquellas pruebas con  $P < 0,05$ . Los contrastes de Tukey y los intervalos de confianza (IC) del 95% se obtuvieron con el paquete emmeans (Lenth et al., 2020). Los gráficos se realizaron utilizando la biblioteca ggplot2 (Wickham et al., 2020).

### 5.2.3.1 Efecto de la reducción del número de YLS de *Delphacodes kuscheli* sobre la capacidad biocida de *Beauveria bassiana*. Ensayos de patogenicidad y virulencia

Para los ensayos *in vivo*, se seleccionó al fungicida **PT** por ser uno de los que menor impacto tuvo sobre el crecimiento de *B. bassiana* en los aislados ensayados, por la alta efectividad demostrada en reducir el número de YLS en *D. kuscheli*, y por afectar negativamente los parámetros biológicos evaluados en este insecto.

**Insectos y plantas experimentales:** Ninfas de tercer estadio originarias de una misma cohorte se alimentaron sobre plantas de avena de la variedad Elizabeth, aleatoriamente asignadas a un tratamiento con el fungicida **PT** o a agua destilada como control, siguiendo el protocolo detallado en el Capítulo 2, sección 2.2.4.2, para la obtención de adultos subsimbióticos y controles de *D. kuscheli*. Las semillas de avena se sembraron en macetas plásticas conteniendo tierra fértil y 15 días después, sin ser expuestas a ningún tratamiento, fueron utilizadas como plantas hospederas de los insectos para los ensayos con *B. bassiana*. Tanto insectos como plantas fueron trasladados al CIDEFI. En el ensayo, se utilizaron los adultos obtenidos de ambos tratamientos (control y subsimbióticos) de 0-48 h de emergidos.

**Preparación del inóculo:** *B. bassiana* CEP147 y CEP002 se incubaron en SDAY1/4 durante 10 días a 26 °C y en oscuridad. A partir del micelio se

cosecharon los conidios y se suspendieron en Tween 20 0,01% v/v. La cuantificación de los mismos se efectuó en cámara de Neubauer y la suspensión se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml.

**Acondicionamiento del ensayo:** Se realizaron cuatro tratamientos por cada aislado con un total de tres réplicas independientes por tratamiento. Cada réplica contó con 10 insectos, cinco hembras y cinco machos (30 insectos totales por tratamiento), sobre cinco plantas de avena dentro de una botella plástica de 250 cm<sup>3</sup> que permitió a las plantas estar en contacto con agua esterilizada para mantenerse frescas. Cada grupo de insectos fue asperjado aleatoriamente con 300 µl de la suspensión de conidios anteriormente mencionada o con 300 µl de Tween 20 0,01% v/v, mediante un aerógrafo profesional (modelo 180 con una boquilla de 0,25–0,3 mm de diámetro y una copa de 9 ml de capacidad). Los tratamientos fueron los siguientes: **(i) Insectos con carga natural de YLS asperjados únicamente con Tween. (ii) Insectos subsimbióticos asperjados únicamente con Tween. (iii) Insectos con carga natural de YLS asperjados con la suspensión de conidios. (iv) Insectos subsimbióticos asperjados con la suspensión de conidios.** Luego de la aspersión, las botellas fueron selladas con un film en la parte superior para mantener la humedad que requieren los conidios para la germinación y retener a los insectos a modo de jaula. Se realizaron microperforaciones en el film para permitir la oxigenación del sistema. El ensayo fue trasladado a un fitotrón para mantener las condiciones de temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ), fotoperiodo (16 h luz 8 h oscuridad) y humedad relativa (98-99%) dentro de las jaulas. Al día siguiente se reemplazó el film por tela de *voile*.

**Registro de mortalidad:** Se cuantificó diariamente el número de insectos muertos dentro de cada jaula durante siete días. Los insectos muertos se retiraron de las botellas y se esterilizaron superficialmente sumergiéndolos unos segundos en forma consecutiva en etanol 70%, agua destilada estéril, NaClO 0,5% y nuevamente agua destilada estéril. Finalmente, se los colocó en cámaras húmedas (cápsulas de Petri de 60

mm de diámetro provistas de algodón humedecido con agua destilada estéril y papel de filtro) para estimular el desarrollo externo de micelio (condición necesaria para la dispersión del inóculo y la propagación del mismo dentro de la población de la plaga a controlar). Las cámaras húmedas se incubaron durante tres a cuatro días a 26°C en oscuridad y se registró el número de insectos que desarrollaron micelio externo.

El ensayo se repitió dos veces en el tiempo para cada aislado, contando con un total de 60 insectos por tratamiento.

### 5.2.3.2 Análisis estadístico

La capacidad biocida de los aislados *B. bassiana* CEP147 y CEP002 frente a *D. kuscheli* se estimó mediante el análisis de curvas de supervivencia, utilizando un modelo de regresión de Cox mixto o regresión de riesgos proporcionales (del inglés *proportional hazards regression*). La variable respuesta fue el tiempo en días que transcurrió entre el comienzo del experimento hasta la muerte de un insecto o hasta finalizar el experimento (siete días). La variable explicativa fue el “tratamiento”, categórica y de efectos fijos. Se introdujeron como variables de efectos aleatorios las “réplicas” y la “repetición en el tiempo”. Se verificó la proporcionalidad de riesgos y se confirmó que se cumplieran los supuestos del modelo.

Los análisis se realizaron utilizando el *software* estadístico R versión 4.2.1 (R Core Team, 2022), con el paquete *coxme* (Therneau, 2022). El nivel de significancia empleado fue 0,05 y se consideraron significativas aquellas pruebas con  $P < 0,05$ . Se utilizó el paquete *multcomp* (Hothorn *et al.*, 2022) para realizar comparaciones de medias entre las curvas. Los gráficos de las curvas de supervivencia se realizaron con el paquete *survminer* (Kassambara y Kosinski, 2022).

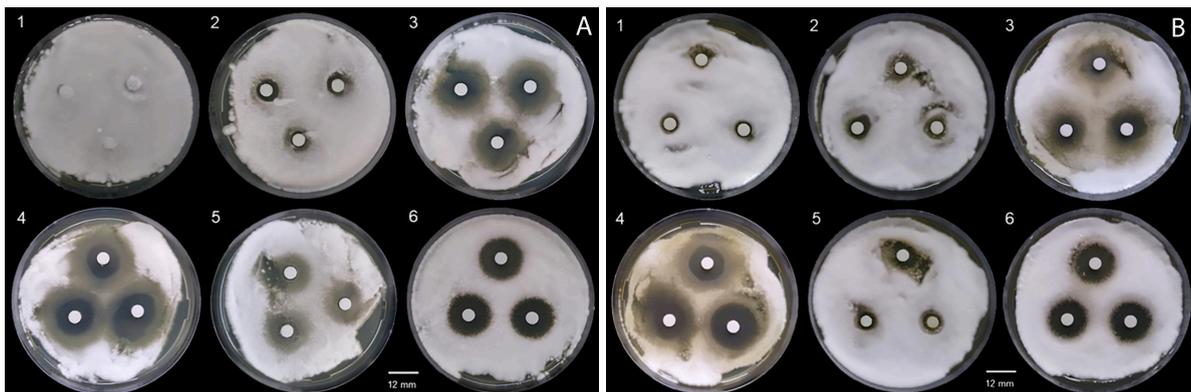
A su vez, se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para evaluar por un lado, las diferencias entre la mortalidad porcentual acumulada y por otro,

las diferencias en la proporción de insectos muertos que desarrollaron micelio externo entre los insectos con carga natural de YLS en comparación a los insectos subsimbióticos, expuestos a cada aislado fúngico.

### 5.3 Resultados

#### 5.3.1 Selección de fungicidas compatibles con el desarrollo de los aislados *B. bassiana* CEP147 y CEP002

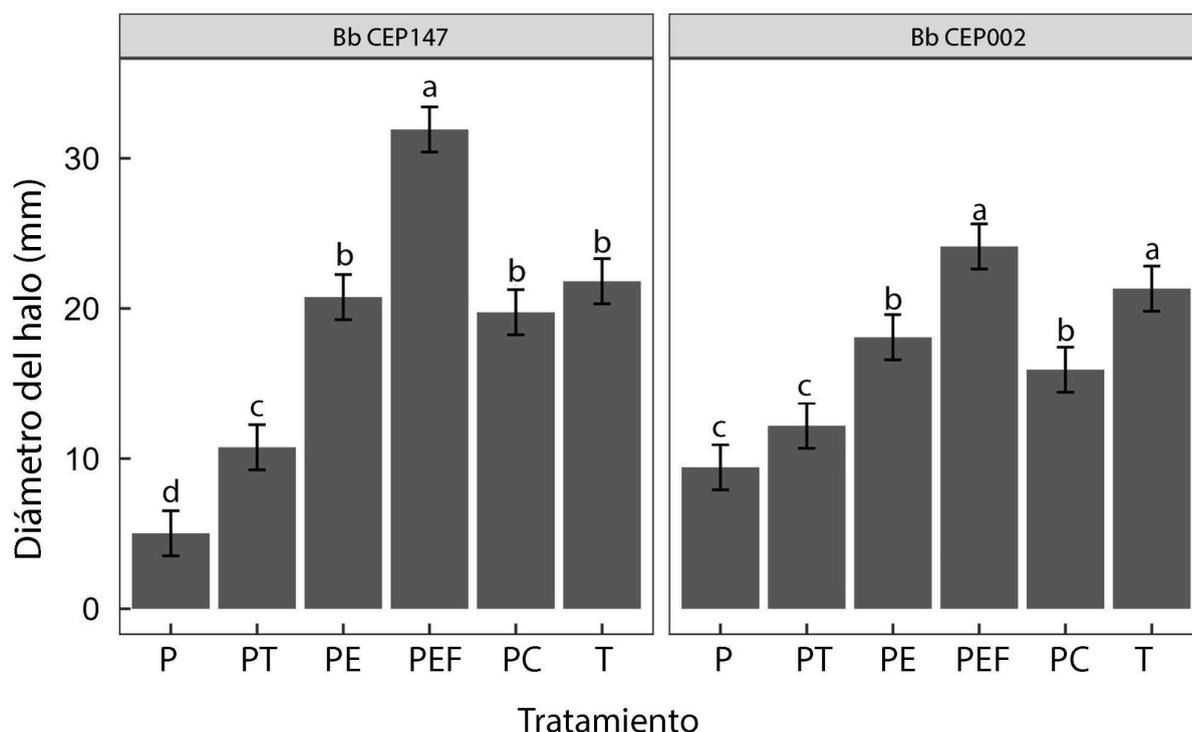
Se asumió que a mayor diámetro del halo de inhibición del crecimiento micelial de *B. bassiana* frente a un fungicida, más susceptible fue el hongo a dicho fungicida (**Fig. 5.1**).



**Fig. 5.1** Inhibición del crecimiento micelial de *Beauveria bassiana* por efecto de los fungicidas. (A) CEP147 y (B) CEP002. (1) P, (2) PT, (3) PE, (4) PEF, (5) PC y (6) T.

Los datos obtenidos mostraron una interacción significativa entre el aislado de *B. bassiana* y el tratamiento con fungicida ( $\chi^2 = 79,24$ ;  $gl=5$ ;  $P < 0,0001$ ), lo que indica que el efecto de un mismo fungicida sobre el crecimiento de *B. bassiana* y formación del halo de inhibición alrededor del disco, no fue el mismo para cada aislado fúngico. Sin embargo, los

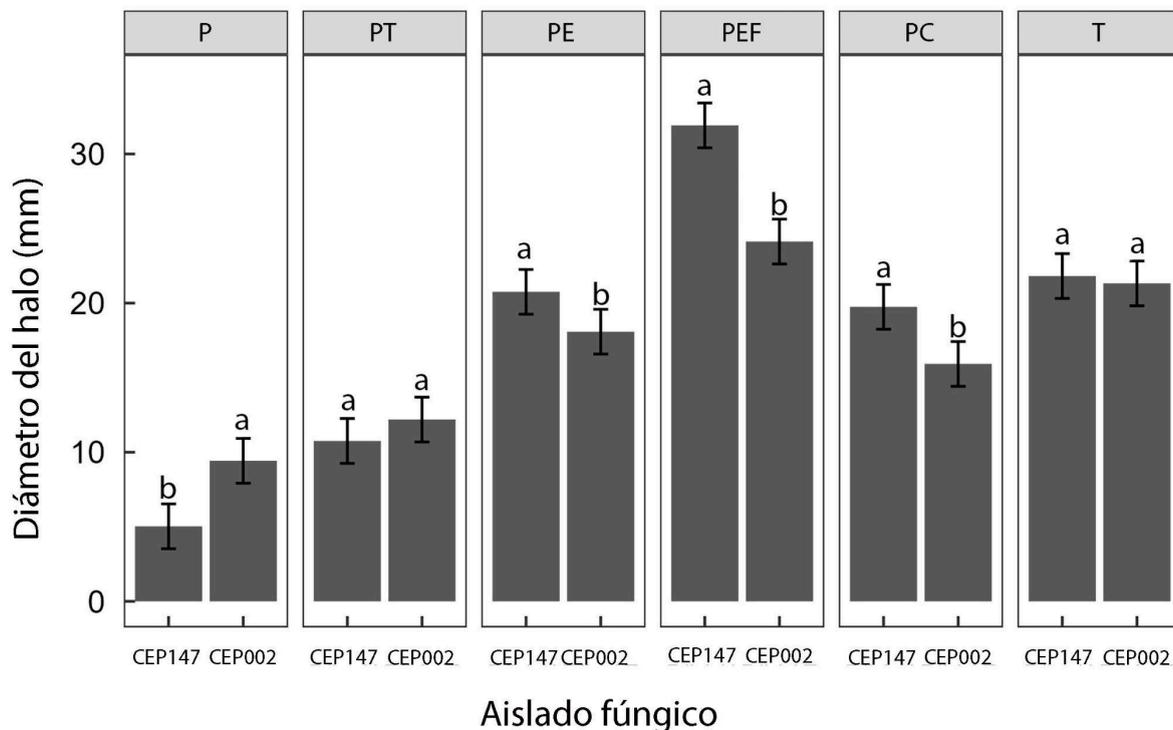
discos cargados con los fungicidas P y PT fueron los que ocasionaron una menor inhibición del crecimiento micelial (tanto de *B. bassiana* CEP147 como de *B. bassiana* CEP002), evidenciada por halos de menor diámetro en comparación con los fungicidas restantes (**Fig. 5.2**).



**Fig. 5.2 Tamaño del halo de inhibición del crecimiento micelial generado por los distintos fungicidas en los aislados *B. bassiana* CEP147 y CEP002.** Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los fungicidas según el aislado fúngico. **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **T**= tebuconazol, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad.

A su vez, la inhibición del crecimiento micelial por acción del fungicida PT no presentó diferencias significativas entre ambos aislados, registrándose en promedio halos de 10,76 mm (IC 95% 9,25 – 12,25 mm)

para el aislado CEP147 y de 12,19 mm (IC 95% 10,69- 13,69 mm) para el aislado CEP002 (**Fig. 5.3**).



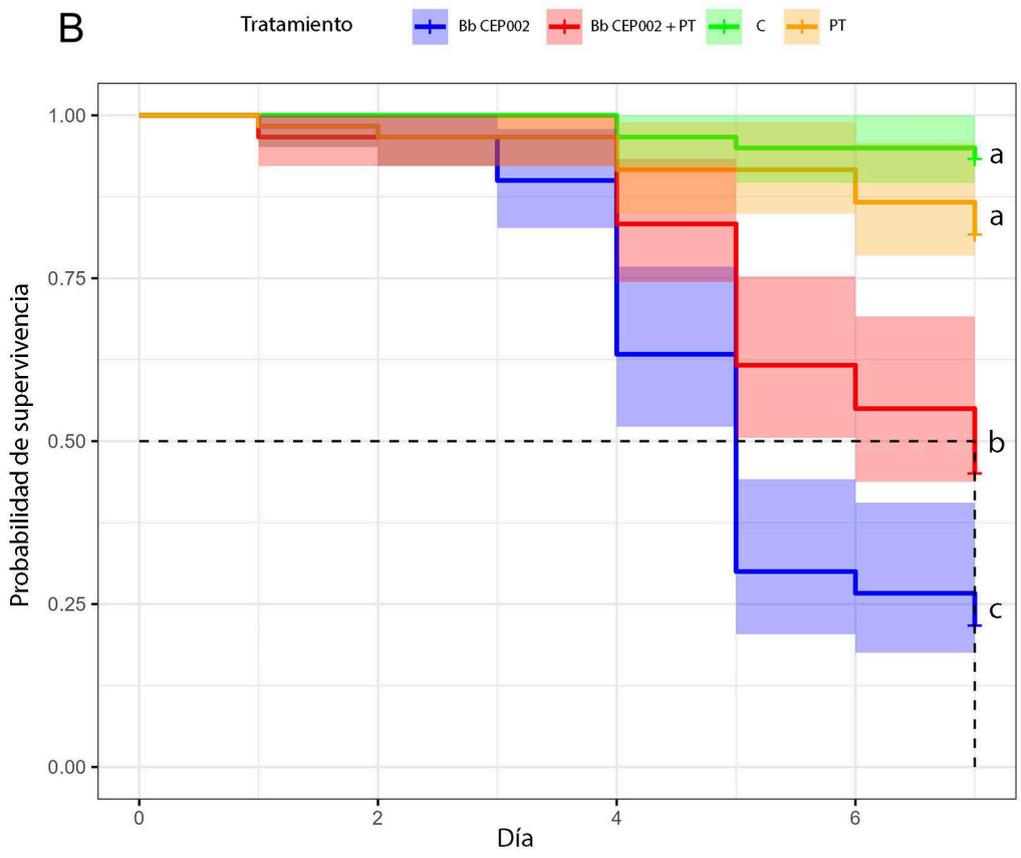
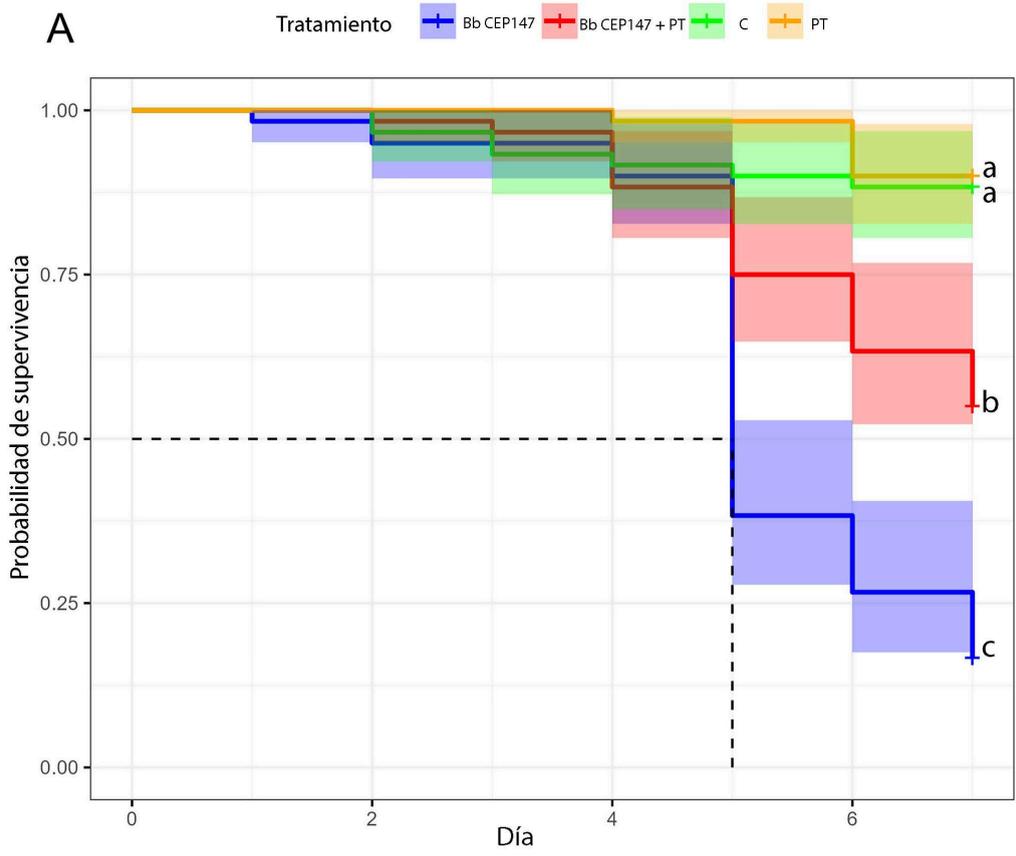
**Fig. 5.3** Tamaño del halo de inhibición del crecimiento micelial generado por los distintos fungicidas en los aislados *B. bassiana* CEP147 y CEP002. Se muestran las medias estimadas por el modelo y sus IC 95%. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas entre los aislados fúngicos según cada fungicida. **P**= protioconazol, **PT**= protioconazol y trifloxistrobin, **T**= tebuconazol, **PC**= picoxistrobin y ciproconazol, **PE**= piraclostrobin y epoxiconazol, **PEF**= piraclostrobin, epoxiconazol y fluxapiroxad.

### 5.3.2 Efecto de la reducción del número de YLS de *Delphacodes kuscheli* sobre la capacidad biocida de *Beauveria bassiana*. Ensayos de patogenicidad y virulencia

Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de los insectos entre tratamientos, tanto para los ensayos realizados con el aislado

*B. bassiana* CEP147 ( $\chi^2 = 76,21$ ; gl= 3;  $P < 0,001$ ) como con *B. bassiana* CEP002 ( $\chi^2 = 66,84$ ; gl= 3;  $P < 0,001$ ). Es decir, la supervivencia dependió del tratamiento aplicado a los insectos. Para ambos aislados fúngicos se observó el mismo patrón. La probabilidad de supervivencia de los insectos con carga natural de YLS asperjados con la suspensión de conidios de *B. bassiana* fue significativamente menor en comparación a la del resto de los tratamientos, seguida por la probabilidad estimada para insectos subsimbióticos asperjados con la suspensión de conidios de *B. bassiana*. No se encontraron diferencias entre las curvas de supervivencia de insectos con carga natural de YLS e insectos subsimbióticos, ambos asperjados únicamente con Tween (**Fig. 5.4**).

A su vez, la probabilidad de supervivencia de los insectos con carga natural de YLS tratados con la suspensión de conidios de *B. bassiana* CEP147 disminuyó significativamente a un 38% al quinto día. En cambio, la probabilidad de supervivencia de los insectos subsimbióticos se mantuvo por encima del 50% hasta el séptimo día. De manera similar, la probabilidad de supervivencia de los insectos con carga natural de YLS tratados con la suspensión de conidios de *B. bassiana* CEP002 disminuyó significativamente a un 30% al quinto día. En cambio, la probabilidad de supervivencia de los insectos subsimbióticos se redujo a menos del 50% al séptimo día, cuando se dio por finalizado el ensayo (**Fig. 5.4, Anexo 5.5, Tabla 1**).



**Fig 5.4 Probabilidad de supervivencia de insectos con carga natural de YLS y subsimbióticos expuestos a los aislados *Beauveria bassiana* CEP147 (A) y CEP002 (B), durante siete días.** Las líneas representan la media y el área sombreada el intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas de cada curva denotan diferencias significativas entre los tratamientos. **C**= Insectos con carga natural de YLS asperjados únicamente con Tween (n=60). **PT**= Insectos subsimbióticos asperjados únicamente con Tween (n=60). **Bb**= Insectos con carga natural de YLS asperjados con la suspensión de conidios (n=60). **Bb + PT**= Insectos subsimbióticos asperjados con la suspensión de conidios (n=60).

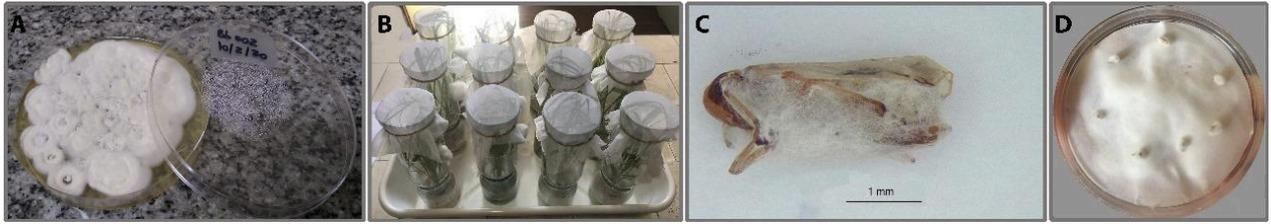
Asimismo, en los tratamientos con ambos aislados fúngicos se observó una mortalidad porcentual acumulada significativamente mayor en los insectos con carga natural de YLS que en los subsimbióticos (*B. bassiana* CEP147:  $\chi^2 = 17,542$ , gl= 1,  $P < 0,001$ . *B. bassiana* CEP002:  $\chi^2 = 6,3375$ , gl= 1,  $P = 0,012$ ) (**Tabla 5.1**). En contraposición, no se encontraron diferencias significativas en la mortalidad observada bajo los tratamientos con ambos aislados fúngicos entre la proporción de insectos con carga natural de YLS y subsimbióticos que desarrollaron micelio externamente (*B. bassiana* CEP147:  $\chi^2 = 2,57$ ; gl= 1;  $P = 0,11$  y *B. bassiana* CEP002:  $\chi^2 = 0,033$ ; gl= 1;  $P = 0,8571$ ) (**Tabla 5.2**).

**Tabla 5.1.** Mortalidad total observada en los tratamientos con los aislados *B. bassiana* CEP147 y CEP002. Se compara la mortalidad porcentual acumulada de los tratamientos (**Bb**= Insectos con carga natural de YLS asperjados con la suspensión de conidios vs. **Bb + PT**= Insectos subsimbióticos asperjados con la suspensión de conidios) para cada aislado fúngico. En las columnas se indican los tratamientos, el número inicial de insectos vivos al comienzo de los ensayos, el número total de insectos muertos al final de los ensayos, el porcentaje de mortalidad acumulada.  $P > 0,05$ = ns; . = marginalmente significativa; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ .

	Total de insectos	Mortalidad total acumulada	Mortalidad porcentual acumulada		
Tratamiento	n	n	%	$\chi^2$	P
Bb CEP147	60	50	83,33	17,54	< 0,001***
Bb CEP147 + PT	60	27	45		
Bb CEP002	60	47	78,33	6,34	0,01**
Bb CEP002 + PT	60	33	55		

**Tabla 5.2.** Proporción de insectos muertos con carga natural de YLS y subsimbióticos bajo los tratamientos con *B. bassiana* CEP147 y CEP002 que desarrollaron micelio externamente en relación al número total de insectos muertos. **Bb**= Insectos con carga natural de YLS asperjados con la suspensión de conidios , **Bb + PT**= Insectos subsimbióticos asperjados con la suspensión de conidios.

	Total de insectos muertos	Insectos muertos que desarrollaron micelio externo			
Tratamiento	n	n	%	$\chi^2$	P
Bb CEP147	50	44	88	2,57	0,11
Bb CEP147 + PT	27	19	70,37		
Bb CEP002	47	35	74,47	0,033	0,86
Bb CEP002 + PT	33	26	78,79		



**Fig. 5.5. Ensayo de patogenicidad. (A)** Cultivo esporulado de *Beauveria bassiana* a partir del cual se prepara el inóculo. **(B)** Jaulas con 10 insectos a los que se les aplicaron los tratamientos. **(C)** Ejemplar de *Delphacodes kuscheli* infectado con *Beauveria bassiana*. **(D)** Detalle de una cámara húmeda con siete insectos mostrando el desarrollo externo de micelio.

## 5.4 Discusión

La mayoría de las investigaciones relacionadas con microorganismos que participan en la defensa de los insectos hospederos contra sus enemigos naturales se han centrado principalmente en simbiontes facultativos bacterianos (Vorburger y Perlman, 2018; Zytynska *et al.*, 2021). Para este capítulo, abordamos el estudio del sistema que comprende a la chicharrita *D. kuscheli*, a sus endosimbiontes fúngicos obligados (YLS) y al hongo entomopatógeno *B. bassiana*, con el objetivo principal de evaluar si los YLS contribuyen de alguna manera en la protección del insecto frente a este patógeno.

Los ensayos *in vitro* mediante discos de antibiograma permitieron seleccionar al fungicida **PT** para utilizarlo en los ensayos *in vivo*. Este fungicida se seleccionó debido a que: **(i)** resultó ser el más compatible con el desarrollo de ambos aislados de *B. bassiana*, **(ii)** fue uno de los que más redujo el número de YLS (Capítulo 2, sección 2.3.2), **(iii)** provocó una disminución general en el desempeño del insecto (Capítulo 3) y **(iv)** causó alteraciones en la cutícula y en la melanización de la misma (Capítulo 3, sección 3.3.4).

Contrariamente a lo esperado, al comparar las curvas de supervivencia de los insectos tratados con la suspensión de conidios de ambos aislados fúngicos, se detectó una menor probabilidad de supervivencia en los insectos con carga natural de YLS respecto de los subsimbióticos, es decir, se redujo la capacidad biocida de ambos aislados de *B. bassiana* en insectos subsimbióticos. Dichos resultados también se vieron reflejados en la mortalidad porcentual acumulada de los insectos al finalizar el experimento. Tanto en los tratamientos con el aislado *B. bassiana* CEP147 como con *B. bassiana* CEP002, se observaron los mayores porcentajes de mortalidad acumulada cuando fueron inoculados sobre insectos con carga natural de YLS (83,33% y 78,33% respectivamente) en comparación a insectos subsimbióticos (45% y 55%, respectivamente). Consecuentemente, el tiempo de acción de ambos aislados de *B. bassiana* también se vio afectado por el tratamiento, observándose un retraso en la mortalidad de los insectos subsimbióticos. Asimismo, tanto los insectos muertos con carga natural de YLS como los subsimbióticos tratados con ambos aislados fúngicos, mostraron más de un 70% de desarrollo externo de micelio. Esto indica que la infección fúngica fue efectivamente la principal causa de muerte y que la carga de YLS no afectó la última etapa del ciclo infectivo de *B. bassiana*, posibilitando la normal dispersión del inóculo y la posible propagación del mismo en la población del insecto.

Son numerosos los registros de protección mediada/conferida por simbioses en insectos, principalmente por parte de bacterias facultativas que hacen que sus hospederos sean más resistentes al ataque de enemigos naturales (Boucias *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2023), entre otros factores, por la producción de toxinas (Oliver y Perlman, 2020). Por mencionar algunos ejemplos, se encuentra la interacción entre *Paederus* sp (Coleoptera: Staphylinidae) y bacterias del género *Pseudomonas*, donde los simbioses secretan pederina (Kellner, 2001, 2002), una toxina que evita que las larvas del coleóptero sean comidas por arañas lobo (Kellner y Dettner, 1996). O entre *Drosophila neotestacea* Grimaldi, James y Jaenike y

distintas cepas de *Spiroplasma*, donde la presencia de las bacterias impide que las moscas infectadas con un nematodo parásito pierdan la fertilidad y además favorecen a que los nematodos prácticamente no produzcan juveniles infecciosos (Jaenike *et al.*, 2010). Además, ciertas cepas de *Spiroplasma* en otras especies de *Drosophila*, ocasionan la muerte de larvas de avispa parasitoides (Xie *et al.*, 2010, 2014). También algunas cepas de *Spiroplasma*, *Regiella*, *Rickettsia* y *Rickettsiella*, protegen al áfido *Acyrtosiphon pisum* contra el entomopatógeno *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales), reduciendo la mortalidad de los pulgones y la esporulación del hongo (Scarborough *et al.*, 2005; Łukasik *et al.*, 2013). Asimismo, los géneros *Lagriia* sp y *Ecnolagriia* sp (Coleoptera: Lagriinae) albergan bacterias del género *Burkholderia* que protegen a sus huevos y larvas de hongos patógenos mediante la producción de toxinas (Flórez y Kaltenpoth, 2017; Flórez *et al.*, 2018).

Por otro lado, son escasos los registros de simbioses nutricionales obligadas que participan en la defensa de sus hospederos y, hasta nuestro conocimiento, en ninguno de ellos intervienen endosimbiontes fúngicos. Un ejemplo es el reportado por Nakabachi *et al.* (2013) en el psílido de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). El insecto alberga en su bacterioma a *Candidatus* Profftella armatura, un endosimbionte nutricional obligado, cuyos genes se encuentran dedicados a la síntesis de riboflavina, biotina y de diaforina, un metabolito citotóxico que se asemeja a la pederina de los escarabajos *Paederus* (Gill *et al.*, 2017). Un segundo ejemplo es el reportado por Kanyile *et al.* (2022). Los investigadores estudiaron el sistema formado por el escarabajo *Oryzaephilus surinamensis* (L) y el endosimbionte nutricional obligado *Candidatus* Shikimatogenerans silvanidophilus, que suplementa a su hospedero con el precursor de la tirosina, aminoácido que interviene en la formación de la cutícula (Hirota *et al.*, 2017; Engl *et al.*, 2018; Kiefer *et al.*, 2021). Los escarabajos aposimbóticos obtenidos en laboratorio, exhibieron una cutícula más delgada y menos melanizada que los controles, y

resultaron más vulnerables ante el ataque de depredación por arañas lobo y a la infección fúngica por *B. bassiana*. Los investigadores concluyeron que las deficiencias en la cutícula de los escarabajos subsimbióticos podrían ser la causa de su vulnerabilidad.

Como se detalló anteriormente, la reducción experimental de los endosimbiontes nutricionales obligados de *D. kuscheli*, los YLS, dio como resultado un fenotipo de insectos caracterizado por una cutícula con alteraciones en el patrón general de coloración y menos melanizada (Capítulo 3, sección 3.3.4). Este fenotipo fue consistente con lo observado por Kanyile *et al.* (2022) y por otros investigadores en distintos grupos de insectos donde se reduce o elimina experimentalmente la carga de sus endosimbiontes (Kikuchi *et al.*, 2016; Hirota *et al.*, 2017; Duplais *et al.*, 2021). Sin embargo, a pesar de estas alteraciones en la cutícula, la probabilidad de supervivencia de las chicharritas subsimbióticas asperjadas con la suspensión de conidios de *B. bassiana* fue mayor en comparación a los insectos con carga natural de YLS asperjados con la misma suspensión. También fue mayor la cantidad de días que demoraron los insectos subsimbióticos en morir a causa de la infección fúngica.

La contradicción entre los resultados obtenidos en los ensayos de este capítulo y lo esperado basado en la literatura, deja en evidencia la complejidad de las interacciones simbióticas y sus consecuencias en la resistencia a patógenos. Una posible explicación para estos resultados podría deberse a algún tipo de inhibición *in vivo* de los aislados fúngicos ocasionada por el fungicida utilizado para la reducción de los YLS, que no fue demostrada en las pruebas *in vitro* de antibiograma. Como se detalla en el Capítulo 2, sección 2.3.6, la reducción de YLS se mantiene al menos hasta el séptimo día de los insectos en estado adulto. Pero los insectos no fueron expuestos directamente al fungicida, sino que se colocaron sobre las plantas 24 h posteriores a la aplicación del mismo y fueron utilizados en promedio 21 días después de la aplicación del fungicida (IC 95% 18-24), una vez que mudaron al estado adulto. Por lo tanto, parece poco probable que

esta haya sido la causa. Sin embargo, para obtener respuestas sobre una posible incompatibilidad del fungicida seleccionado sobre *B. bassiana*, sería necesario realizar un análisis químico de los tejidos de insectos subsimbióticos en búsqueda de rastros del fungicida que puedan estar afectando al entomopatógeno.

Aún cuando en los trabajos mencionados anteriormente existe un patrón de protección mediada por simbioses contra enemigos naturales, cada sistema insecto-simbionte es particular y puede que la protección conferida por un simbiote se limite a uno o pocos enemigos naturales y no a otros. Un ejemplo es el reportado por Parker *et al.* (2013) donde muestran que el endosimbionte facultativo bacteriano *Regiella insecticola*, protege a ciertos pulgones del entomopatógeno fúngico especialista *Zoophthora occidentalis* (Zygomycota: Entomophthorales) pero no de *B. bassiana* que es un entomopatógeno generalista que ataca también a otros insectos. Por lo tanto, sería interesante explorar la interacción entre *D. kuscheli* subsimbióticos y otros enemigos naturales, como parasitoides o depredadores.

En bibliografía reciente, se han documentado casos donde la presencia de simbioses resultó ser directamente contraproducente para la defensa del insecto ante ciertos enemigos naturales. Un estudio realizado por Ramírez-Cáceres *et al.* (2019) reveló que los pulgones que alojaban a *R. insecticola* experimentaron una mayor depredación y no mejoraron sus defensas frente al coccinélido *Hippodamia variegata* (Goeze). Adicionalmente, Inchauregui *et al.* (2023) mostraron que las bacterias facultativas albergadas por ciertos pulgones, entre ellas *R. insecticola* y *Serratia symbiotica*, confirieron mayor resistencia a sus hospederos contra la infección ocasionada por el hongo entomopatógeno especialista *Pandora neoaphidis*. Sin embargo, esta protección no resultó efectiva contra el hongo generalista *Batkoa apiculata*. Llamativamente, los investigadores evidenciaron que los pulgones que albergaban una cepa específica de *R. insecticola* (CF7) fueron inclusive más susceptibles a la

infección por *B. apiculata*. Finalmente, Sinotte *et al.* (2018) informaron un caso muy similar a lo observado en este capítulo de tesis. Ciertas hormigas del género *Camponotus* se benefician de la suplementación de nutrientes por parte del endosimbionte bacteriano *Blochmannia* (Degnan *et al.*, 2004). Los investigadores encontraron que la reducción experimental de *Blochmannia* daba como resultado colonias con menor número de individuos, hormigas de menor tamaño corporal y una cutícula más clara y menos melanizada, lo que demostró la función del endosimbionte en el desarrollo general de las hormigas y en particular, de la cutícula. Se ha reportado en varios insectos que el grado de melanización cuticular se relaciona con una mayor resistencia a los patógenos (Evison *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2021), aunque la melanina utilizada en la formación de la cutícula y la respuesta inmune (cicatrización de heridas o encapsulación) parecen estar reguladas por diferentes vías (Tang *et al.*, 2006). En su trabajo, los investigadores observaron que las hormigas con carga natural de endosimbiontes exhibieron una mayor mortalidad después de la exposición al hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum*, en comparación con las hormigas subsimbióticas. Esto sugiere que el simbiote reduce la capacidad de las hormigas para defenderse de las infecciones fúngicas, a pesar de la baja disponibilidad de melanina para ayudar a generar una respuesta inmune. Se sabe que las hormigas *Camponotus floridanus* (Buckley) toleran al endosimbionte dentro de los bacteriocitos y los ovarios y que alteran su expresión de inmunomoduladores para reducir su respuesta inmune dentro de estos tejidos (Ratzka *et al.*, 2013; Kupper *et al.*, 2016). Durante la infección, *M. brunneum* puede romper físicamente los tejidos y células del hospedero con sus hifas, lo que permite al endosimbionte escapar de los bacteriocitos. Esto podría provocar una respuesta inmune, análoga a una superinfección, acelerando y aumentando la mortalidad de las hormigas. La hipótesis de los investigadores podría ser explorada para *D. kuscheli*, ya que los YLS se concentran en el interior de las células del cuerpo graso del abdomen y

pueden ser liberados al resto del cuerpo del insecto durante la infección del patógeno. Se requerirían análisis histológicos que documenten la progresión de la infección de *B. bassiana* dentro del cuerpo graso de *D. kuscheli*, vinculados a un análisis de la expresión de genes inmunes para comprender la base mecanicista de este fenómeno.

En resumen, los resultados de este capítulo desafían la concepción convencional de que la presencia de endosimbiontes confiere resistencia a sus hospederos ante los patógenos. La reducción de YLS parece haber desencadenado respuestas que mejoraron la capacidad de *D. kuscheli* para enfrentar el ataque del hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Estos hallazgos evidencian que la relación entre los endosimbiontes y la resistencia a patógenos no sigue un patrón lineal y que factores adicionales, tal vez en la regulación inmunitaria, podrían haber tenido un papel más relevante en la determinación de la susceptibilidad del insecto. Los modelos tradicionales de “patógeno-hospedero”, suponen una interacción directa entre ambas partes, sin ninguna interferencia de los simbiosiontes asociados (Uma Devi *et al.*, 2008; Valero-Jiménez *et al.*, 2016; Erper *et al.*, 2022), por lo que sería necesario identificar y contemplar estas interacciones tripartitas y los mecanismos subyacentes de protección para mejorar la comprensión de los factores que afectan la dinámica de estas comunidades y planificar así mejores estrategias de control.

## 5.5 Anexo

**Tabla 1.** Número de individuos que sobrevivieron por día en cada tratamiento en el ensayo con *B. bassiana* CEP147 **(A)** y en el ensayo con *B. bassiana* CEP002 **(B)**. *B. bassiana*= Insectos con carga natural de YLS asperjados con la suspensión de conidios. *B. bassiana* + PT= Insectos subsimbióticos asperjados con la suspensión de conidios. C= Insectos con carga natural de YLS asperjados únicamente con Tween. PT= Insectos subsimbióticos asperjados únicamente con Tween.

**A**

Días de ensayo	Tratamientos			
	<i>B. bassiana</i> CEP147	<i>B. bassiana</i> CEP147 + PT	C	PT
0	60	60	60	60
1	59	60	60	60
2	57	59	58	60
3	57	58	56	60
4	54	53	55	59
5	23	45	54	59
6	16	38	53	54
7	10	33	53	54

**B**

Días de ensayo	Tratamientos			
	<i>B. bassiana</i> CEP002	<i>B. bassiana</i> CEP002 + PT	C	PT
0	60	60	60	60
1	59	58	60	59
2	58	58	60	58
3	54	58	60	58
4	38	50	58	55
5	18	37	57	55
6	16	33	57	55
7	13	27	56	49

**Tabla 2.** Mortalidad confirmada por infección fúngica de los aislados *B. bassiana* CEP147 y CEP002. Se compara la mortalidad porcentual acumulada de los tratamientos (**Bb**= Insectos con carga natural de YLS asperjados con la suspensión de conidios vs. **Bb + PT**= Insectos subsimbióticos asperjados con la suspensión de conidios) para cada aislado fúngico. El n inicial (total de insectos) está compuesto de los insectos que sobrevivieron al finalizar el ensayo + los insectos en los que luego de morir mostraron desarrollo de micelio externamente, descartando a aquellos cuya mortalidad no fue confirmada por infección fúngica. Se realizó una prueba de Chi-cuadrado aplicando la corrección de Yates. \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001. Se observa que hay significativamente mayor proporción de insectos muertos en los tratamientos de *B. bassiana* CEP 147 Y CEP 002 con carga natural de YLS en comparación a los subsimbióticos.

	Total de insectos	Insectos vivos	Insectos muertos con micelio externo			
Tratamiento	n	n	n	%	$\chi^2$	P
Bb CEP147	54	10	44	81,48	20,37	< 0,001 ***
Bb CEP147 + PT	52	33	19	36,54		
Bb CEP002	48	13	35	72,92	5,04	0,024 *
Bb CEP002 + PT	53	27	26	49,06		



# CAPÍTULO 6

Conclusiones generales,  
consideraciones finales  
y perspectivas futuras



## 6.1 Conclusiones generales

En el marco de esta tesis, se buscó evaluar la respuesta en distintos aspectos de la biología de *Delphacodes kuscheli* frente a la reducción de sus endosimbiontes mutualistas fúngicos, los YLS. Además, se propuso investigar la capacidad biocida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* ante la disminución de los YLS en el insecto hospedero. Se seleccionó a *D. kuscheli* como modelo biológico debido a su papel como principal vector del virus del Mal de Río Cuarto del maíz, y a *B. bassiana* por ser un patógeno efectivo contra esta chicharrita. Cabe destacar que las metodologías y técnicas empleadas para alcanzar dichos objetivos podrían adaptarse y aplicarse a futuros estudios sobre otras especies de delfácidos y hongos entomopatógenos. Con este enfoque integral, se pretendió establecer las bases para futuras estrategias de control de plagas más efectivas y sostenibles.

A continuación, se detallan los resultados y conclusiones más relevantes:

- Se desarrolló con éxito un protocolo para reducir el número de YLS en *D. kuscheli* mediante la aplicación de fungicidas sistémicos en las plantas hospederas de estos insectos. La combinación más efectiva para la obtención de adultos subsimbióticos, fue la aplicación de 500 µl [0,1%] del fungicida CRIPTON® (protioconazol y trifloxistrobin) en plantas de avena sobre las que se alimentaron ninfas de tercer estadio, logrando más del 80% de reducción de YLS en hembras y más del 59% en machos.

Es la primera vez que se desarrolla una técnica que implica el uso de fungicidas en la reducción de YLS para estudios de laboratorio en un delfácido neotropical. Contar con este protocolo, permitió evaluar la relevancia de los YLS en el *fitness* del insecto.

- Las ninfas de tercer estadio, alimentadas sobre plantas tratadas con el fungicida CRIPTON® (protioconazol y trifloxistrobin), exhibieron una tasa de mortalidad elevada, aproximadamente del 50%, experimentaron un incremento en el tiempo de desarrollo ninfal y emergieron como adultos de pequeño tamaño, con cutículas poco melanizadas. Además, las hembras acumularon mayor cantidad de ácido úrico en sus tejidos. Asimismo, los adultos tuvieron una baja capacidad para reproducirse, dejando escasa o nula descendencia. Los efectos de la reducción de los YLS no sólo reflejaron la contribución nutricional de estos endosimbiontes a *D. kuscheli* sino también la importancia de contar con técnicas de reducción de endosimbiontes *in vivo* para dilucidar las interacciones nutricionales en esta simbiosis mutualista.
- La técnica *Electrical Penetration Graph* reveló que las hembras subsimbióticas modificaron su comportamiento alimentario. Las mismas, demoraron más tiempo en insertar los estiletes en el tejido vegetal, realizaron un mayor número de pruebas hasta localizar el floema y tardaron más en lograr la ingestión. Además, permanecieron más tiempo sin insertar los estiletes en el tejido vegetal y menos tiempo ingiriendo savia floemática en comparación al control. Estos resultados reflejan que la selección y explotación de la planta hospedera como recurso nutricional no sólo está determinada por las capacidades metabólicas de los propios insectos, sino también, por su microbiota asociada. Las interacciones mutualistas pueden tener un papel crucial en la diversificación evolutiva de los insectos fitófagos que se alimentan de savia al facilitar la expansión hacia nuevos nichos ecológicos.

- El fungicida PT demostró ser el más compatible de los seis fungicidas testeados *in vitro* frente a los aislados *B. bassiana* CEP147 y CEP002. Los adultos subsimbióticos mostraron una mayor resistencia frente a ambos aislados fúngicos, evidenciada por una mayor probabilidad de supervivencia y un retraso en la mortalidad en comparación a los insectos con carga natural de YLS. Estos resultados sugieren que los YLS no confieren resistencia frente a *B. bassiana*, sino por el contrario, su presencia hace que los insectos resulten más susceptibles al ataque de este entomopatógeno. Esta evidencia refleja que los costos y beneficios de la simbiosis pueden cambiar, produciendo resultados negativos o positivos según las diferentes circunstancias a las que se enfrenta el insecto. Los YLS que son obligados para el normal desarrollo de *D. kuscheli*, parecen ser contraproducentes frente al ataque de este entomopatógeno.

Estos hallazgos en conjunto destacan que *Delphacodes kuscheli*, al igual que otros insectos, ya no deben considerarse como organismos aislados y, en su lugar, deben estudiarse abarcando a los simbiosiontes con los cuales interactúan. Es evidente que la microbiota asociada influye en el desarrollo, la fisiología, la supervivencia y posiblemente también, en la inmunidad de sus hospederos.

## **6.2 Consideraciones finales y perspectivas futuras**

De los resultados de esta tesis, se desprenden varias líneas para ser exploradas en investigaciones futuras, las cuales se detallan a continuación:

- Incorporar técnicas de silenciamiento génico dirigidas a inhibir la actividad de genes vitales para los YLS. De esta manera se lograría disminuir los efectos colaterales que pueden tener el “shock térmico”

o los fungicidas utilizados para reducir el número de YLS y mejorar el estudio de esta interacción simbiótica.

- Secuenciar el genoma de los YLS a fin de conocer las funciones específicas que estos cumplen y analizar el transcriptoma del cuerpo graso de *D. kuscheli*, principal tejido que aloja a los YLS, a fin de identificar posibles diferencias entre los patrones de expresión génica en insectos controles y subsimbióticos.
- Evaluar la participación de los YLS en procesos fisiológicos de *D. kuscheli* tales como el desarrollo embrionario, el metabolismo del esterol, la muda, esclerotización y melanización de la cutícula.
- Investigar la participación de los YLS en relación al reconocimiento y aceptación de la planta de avena por parte de los insectos. Particularmente si estos endosimbiontes pueden intervenir indirectamente en la síntesis de proteínas salivales necesarias para el proceso de alimentación.
- Examinar si el retraso en la inserción de los estiletes y la demora en la localización e ingestión del floema también ocurre en ninfas subsimbióticas. Ya que las demandas nutricionales de los insectos cambian a lo largo de su ciclo de vida para cumplir con las necesidades de crecimiento, es posible que la alimentación se vea alterada de acuerdo con la etapa de desarrollo del insecto o inclusive con el sexo, por lo que sería interesante examinar el comportamiento alimentario en estadios ninfales y en machos adultos.
- Estudiar la interacción de *D. kuscheli* subsimbióticos con otro hospedante como el maíz que no resulta preferencial para el insecto y si, de alguna manera, la reducción en el número de YLS afecta su

competencia vectorial en la transmisión del virus del Mal de Río Cuarto.

- Explorar la interacción entre *D. kuscheli* subsimbióticos y otros enemigos naturales ya que cada sistema insecto-simbionte es particular. Podría ser frente a otros hongos entomopatógenos o frente a parasitoides y depredadores.
- Realizar análisis histológicos que documenten la progresión de la infección de *B. bassiana* dentro del cuerpo graso del insecto, vinculados a un análisis de la expresión de genes inmunes para comprobar si la abundancia de YLS puede ser perjudicial para *D. kuscheli* frente a este hongo patógeno a nivel del sistema inmune.

# *BIBLIOGRAFÍA*



## Bibliografía

- Alizadeh, A., Samih, M. A., Khezri, M. y Riseh, R. S. (2007). Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9(1), 31-34.
- Anbutsu, H., Moriyama, M., Nikoh, N., Hosokawa, T., Futahashi, R., Tanahashi, M., ... y Fukatsu, T. (2017). Small genome symbiont underlies cuticle hardness in beetles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), E8382-E8391. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712857114>
- Andersen, S. O. (2010). Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3), 166-178. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.007>
- Angelella, G., Nalam, V., Nachappa, P., White, J. y Kaplan, I. (2018). Endosymbionts differentially alter exploratory probing behavior of a nonpersistent plant virus vector. *Microbial Ecology*, 76, 453-458. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1133-5>
- Ankrah, N. Y., Wilkes, R. A., Zhang, F. Q., Aristilde, L. y Douglas, A. E. (2020). The metabolome of associations between xylem-feeding insects and their bacterial symbionts. *Journal of Chemical Ecology*, 46, 735-744. <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01136-7>
- Argüello Caro, E. B., Maroniche, G. A., Dumón, A. D., Sagadín, M. B., Vas, M. D. y Truol, G. (2013). High viral load in the planthopper vector *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae) is associated with successful transmission of Mal de Río Cuarto virus. *Annals of the Entomological Society of America*, 106(1), 93-99. <https://doi.org/10.1603/AN12076>
- Arneodo, J. D., Guzmán, F. A., Conci, L. R., Laguna, I. G. y Truol, G. A. (2002). Transmission features of Mai de Río Cuarto virus in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. *Annals of Applied Biology*,

141(2), 195-200. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00212.x>

Arneodo, J.D., Guzmán, F.A., Ojeda, S., Ramos, M. L., Laguna, I.G., Conci, L. y Truol, G. (2005). Transmisión del Mal de Río Cuarto virus por ninfas de primer y tercer estadio de *Delphacodes kuscheli*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 40, 187-191. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000200014>

Aronson, A. I., Beckman, W. y Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiological Reviews, 50(1), 1-24. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/mr.50.1.1-24.1986>

Arora, A. K. y Douglas, A. E. (2017). Hype or opportunity? Using microbial symbionts in novel strategies for insect pest control. Journal of Insect Physiology, 103, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.09.011>

Arregui, M. A. y Puricelli, E. (2018). Fungicidas. En M. A. Arregui y E. Puricelli (Eds). Mecanismos de acción de plaguicidas (4a ed pp 107-159), Rosario, Argentina.

Augustyniuk-Kram, A. y Kram, K. J. (2012). Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests. Forest ecosystems: more than just trees. In Tech, Rijeka, 265-294.

Awmack, C. S. y Leather, S. R. (2002). Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. Annual Review of Entomology, 47(1), 817-844. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145300>

Backus, E. A. (1985). Anatomical and sensory mechanisms of leafhopper and planthopper feeding behavior. En L. R. Nault & J. G. Rodriguez (Eds.), The Leafhoppers and Planthoppers (Capítulo 7). Wiley-Interscience.

Backus, E. A., Serrano, M. S. y Ranger, C. M. (2005). Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior, and physiology.

Baker, J. E. y Lum, P. T. M. (1973). Development of aposymbiosis in larvae of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) by dietary treatment with antibiotics. *Journal of Stored Products Research*, 9(4), 241-245. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(73\)90006-4](https://doi.org/10.1016/0022-474X(73)90006-4)

Barringer, L. E., Bartlett, C. R. y Erwin, T. L. (2019). Canopy assemblages and species richness of planthoppers (Hemiptera: Fulgoroidea) in the Ecuadorian Amazon. *Insecta Mundi*, 0726: 1-16. <https://journals.flvc.org/mundi/article/view/116710/114887>

Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review Microbiology*, 59, 155-189. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121041>

Behmer, S. T., Grebenok, R. J. y Douglas, A. E. (2011). Plant sterols and host plant suitability for a phloem-feeding insect. *Functional Ecology*, 25(3), 484-491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01810.x>

Behmer, S. T. y Nes, W. D. (2003). Insect sterol nutrition and physiology: a global overview. *Advances in Insect Physiology*, 31, 1-72.

Behmer, S. T., Olszewski, N., Sebastiani, J., Palka, S., Sparacino, G., Sciarrno, E. y Grebenok, R. J. (2013). Plant phloem sterol content: forms, putative functions, and implications for phloem-feeding insects. *Frontiers in Plant Science*, 4, 370. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00370>

Bell-Roberts, L., Douglas, A. E. y Werner, G. D. (2019). Match and mismatch between dietary switches and microbial partners in plant sap-feeding insects. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1902), 20190065. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0065>

Ben-Yosef, M., Pasternak, Z., Jurkevitch, E. y Yuval, B. (2014). Symbiotic

- bacteria enable olive flies (*Bactrocera oleae*) to exploit intractable sources of nitrogen. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(12), 2695-2705. <https://doi.org/10.1111/jeb.12527>
- Bennett, G. M. y Moran, N. A. (2013). Small, smaller, smallest: the origins and evolution of ancient dual symbioses in a phloem-feeding insect. *Genome Biology and Evolution*, 5(9), 1675-1688. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt118>
- Bennett, G. M. y Moran, N. A. (2015). Heritable symbiosis: the advantages and perils of an evolutionary rabbit hole. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10169-10176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421388112>
- Berasategui, A., Shukla, S., Salem, H. y Kaltenpoth, M. (2016). Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1567-1577. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7186-9>
- Blanton, A. G. y Peterson, B. F. (2020). Symbiont-mediated insecticide detoxification as an emerging problem in insect pests. *Frontiers in Microbiology*, 11, 547108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.547108>
- Boito, G. T. y Ornaghi, J. A. (2008). Rol de los cereales de invierno y su sistema de manejo en la dinámica poblacional de *Delphacodes kuscheli*, insecto vector del MRCV. *Agriscientia*, 25(1), 17-26.
- Boucias, D. G., Zhou, Y., Huang, S. y Keyhani, N. O. (2018). Microbiota in insect fungal pathology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 5873-5888. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9089-z>
- Brentassi, M. E. (2004). Estudio de la interacción planta-insecto. Comportamiento alimentario del vector del "Mal de Río Cuarto del maíz", *Delphacodes kuscheli* Fennah (Insecta: hemiptera:

fulgoromorpha: delphacidae). Tesis doctoral.  
<https://doi.org/10.35537/10915/4563>

Brentassi, M. E. y de la Fuente, D. (2024). Obligate mutualistic heritable symbiosis in sap-feeding insects: an intricate relationship in nature. *Symbiosis*, 1-27. <https://doi.org/10.1007/s13199-023-00965-1>

Brentassi, M. E., de la Fuente, D. y Lameiro, A. (2014). Localización y caracterización morfológica de endosimbiontes obligados de *Delphacodes kuscheli* y *Dalbulus maidis*, dos especies de chicharritas vectoras de enfermedades del cultivo de maíz en Argentina (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Revista Ciencias Morfológicas*, 16(1). <https://revistas.unlp.edu.ar/Morfol/article/view/845>

Brentassi, M. E., Machado Assefh, C. R. y Alvarez, A. E. (2019). The probing behaviour of the planthopper *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae) on two alternating hosts, maize and oat. *Austral Entomology*, 58(3), 666-674. <https://doi.org/10.1111/aen.12383>

Brentassi, M. E., Maciá, A., de la Fuente, D., Cano, M. E. y Marino de Remes Lenicov, A. M. (2017). Food quality affects wing-form, demographic traits and number of yeast-like symbionts (YLS) in the planthopper vector, *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 52(1), 25-36. <https://doi.org/10.1080/01650521.2016.1258107>

Brentassi, M. E., Medina, R., de la Fuente, D., Franco, M. E., Toledo, A. V., Saparrat, M. C. y Balatti, P. A. (2020). Endomycobiome associated with females of the planthopper *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae): A metabarcoding approach. *Heliyon*, 6(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04634>

Brentassi, M. E. y Remes Lenicov, A. M. M. (1999). Oviposición de *Delphacodes kuscheli* (Homoptera-Delphacidae) sobre plantas de

cebada en condiciones de laboratorio. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata, 104 (1), 67-74. <http://revista-vieja.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/view/217>

Brentassi, M. E. y Remes Lenicov, A. M. M. (2007). Feeding behavior of the vector *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Fulgoromorpha: Delphacidae) on maize and oat. Annales de la Société entomologique de France, 43:2, 205-212. <https://doi.org/10.1080/00379271.2007.10697512>

Brooks, M. E., Kristensen, K., Van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., ... y Bolker, B. M. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. The R journal, 9(2), 378-400.

Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms (English translation by Bertha Mueller). Interscience, New York.

Carpane, P. y Catalano, M. I. (2022). Probing behavior of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* on susceptible and resistant maize hybrids. PLoS One, 17(5), e0259481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259481>

Carvalho, M., Schwudke, D., Sampaio, J. L., Palm, W., Riezman, I., Dey, G., ... y Eaton, S. (2010). Survival strategies of a sterol auxotroph. Development, 137(21), 3675-3685. <https://doi.org/10.1242/dev.044560>

Chaves, S., Neto, M. y Tenreiro, R. (2009). Insect-symbiont systems: From complex relationships to biotechnological applications. Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology, 4(12), 1753-1765. <https://doi.org/10.1002/biot.200800237>

Chen, C. C., Cheng, L. L., Hou, R. F. y Kuan, C. C. (1981a). Studies on the intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål: 1. Histological observations and population changes of the symbiote. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 91(1-5), 321-327.

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1981.tb04487.x>

Chen, C. C., Cheng, L. L. y Hou, R. F. (1981b). Studies on intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. II Effects of antibiotics and elevated temperature on the symbiotes and their host. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 92, 440–449. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1981.tb01694.x>

Chen, Y. H., Bernal, C. C., Tan, J., Horgan, F. G. y Fitzgerald, M. A. (2011). Planthopper “adaptation” to resistant rice varieties: changes in amino acid composition over time. Journal of Insect Physiology, 57(10), 1375-1384. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.002>

Cheng, D.J. y Hou, R.F. (2001). Histological observations on transovarial transmission of a yeast-like symbiote in *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera, Delphacidae). Tissue Cell 33(3): 273-279. <https://doi.org/10.1054/tice.2001.0173>

Cheng, Y., Yang, J., Li, T., Li, J., Ye, M., Wang, J., ... y He, G. (2024). Endosymbiotic fungal diversity and dynamics of the Brown Planthopper across developmental stages, tissues, and sexes revealed using circular consensus sequencing. Insects, 15(2), 87. <https://doi.org/10.3390/insects15020087>

Chuche, J., Sauvion, N. y Thiéry, D. (2017). Mixed xylem and phloem sap ingestion in sheath-feeders as normal dietary behavior: Evidence from the leafhopper *Scaphoideus titanus*. Journal of insect Physiology, 102, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.014>

Clay, K. (2014). Defensive symbiosis: a microbial perspective. Functional Ecology, 28(2), 293-298. <https://www.jstor.org/stable/24033665>

Cook, A. G. y Denno, R. F. (1994). Planthopper/Plant Interactions: Feeding Behavior, Plant Nutrition, Plant Defense, and Host Plant Specialization.

En: Denno, R.F., Perfect, T.J. (Eds). Planthoppers: their ecology and management. Springer, Boston, MA, 114-139.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2395-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2395-6_3)

Cornwallis, C.K., van't Padje, A., Ellers, J., Klein, M., Jackson, R., Kiers, E.T., West, S.A. y Henry, L.M. (2023). Symbioses shape feeding niches and diversification across insects. *Nature Ecology & Evolution*, 7, 1022–1044.  
<https://doi.org/10.1038/s41559-023-02058-0>

Costamagna, A. C., Remes Lenicov, A. M. M. y Zanelli, M. (2005). Maize and oat antixenosis and antibiosis against *Delphacodes kuscheli* (Homoptera: Delphacidae), vector of “Mal de Río Cuarto” of maize in Argentina. *Journal of Economic Entomology*, 98(4), 1374-1381.  
<https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.4.1374>

Crotti, E., Balloi, A., Hamdi, C., Sansonno, L., Marzorati, M., Gonella, E., ... y Daffonchio, D. (2012). Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems. *Microbial Biotechnology*, 5(3), 307-317. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00312.x>

Darbro, J. M., Johnson, P. H., Thomas, M. B., Ritchie, S. A., Kay, B. H. y Ryan, P. A. (2012). Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(4), 656. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0455>

de Faria, M. R. y Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237-256.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>

de la Fuente, D., Maciá, A., Brentassi, M. E. y Toledo, A. V. (2021). Systemic fungicides reduce the abundance of yeast-like symbiotes and the performance of the planthopper *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera:

- Delphacidae). *Journal of Applied Entomology*, 145(8), 810-821.  
<https://doi.org/10.1111/jen.12896>
- de la Fuente, D., Maciá, A., Cano, M. E., Toledo, A. V. Y Brentassi, M. E. (2019). Consequences of stress induced by heat on fitness of *Delphacodes kuscheli* and its yeast-like endosymbionts. *Journal of Applied Entomology*, 143, 566–573. <https://doi.org/10.1111/jen.12625>
- de Oliveira Barbosa Bitencourt, R., Corrêa, T. A., Santos-Mallet, J., Santos, H. A., Lowenberger, C., Moreira, H. V. S., ... y da Costa Angelo, I. (2023). *Beauveria bassiana* interacts with gut and hemocytes to manipulate *Aedes aegypti* immunity. *Parasites & Vectors*, 16(1), 1-12.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-023-05655-x>
- Degnan, P. H., Lazarus, A. B., Brock, C. D. y Wernegreen, J. J. (2004). Host-symbiont stability and fast evolutionary rates in an ant-bacterium association: cospeciation of *Camponotus* species and their endosymbionts, Candidatus *Blochmannia*. *Systematic Biology*, 53(1), 95-110. <https://doi.org/10.1080/10635150490264842>
- Denno, R. F. y Roderick, G. K. (1990). Population biology of planthoppers. *Annual Review of Entomology*, 35(1), 489-520.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.35.010190.002421>
- Distéfano, A. J., Conci, L. R., Munoz Hidalgo, M., Guzmán, F., Hopp, H. E. y Del Vas, M. (2002). Sequence analysis of two complete genome segments of Mal de Rio Cuarto virus (MRCV) supported the definition of a putative new species of the Fijivirus genus. *Archives of Virology*, 147, 1699-1709.
- Dolling, W. R. (1991). Hemiptera. Oxford University Press.
- Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of*

- Entomology, 43(1), 17-37. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.17>
- Douglas, A. E. (2006). Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 747-754. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj067>
- Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23(1), 38-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x>
- Douglas, A. E. (2011). Lessons from studying insect symbioses. *Cell host & Microbe*, 10(4), 359-367. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.001>
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60, 17-34. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>
- Douglas, A. E. (2016). How multi-partner endosymbioses function. *Nature Reviews Microbiology*, 14(12), 731-743. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.151>
- Dumón, A. D., Mattio, M. F., Bariles, J., Torrico, A. K., ... y Salomón, A. (2022). Relevamiento e infectividad natural de insectos vectores del Mal de Río Cuarto virus durante el 2020 y 2021. En: XI Congreso Argentino y XII Congreso Latinoamericano de Entomología. La Plata, Argentina (p. 327). Publicación Especial de la Sociedad Entomológica Argentina, ISSN En línea 2953-4178.
- Duplais, C., Sarou-Kanian, V., Massiot, D., Hassan, A., Perrone, B., Estevez, Y., ... y Moreau, C. S. (2021). Gut bacteria are essential for normal cuticle development in herbivorous turtle ants. *Nature Communications*, 12(1), 676. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21065-y>
- Engl, T., Eberl, N., Gorse, C., Krüger, T., Schmidt, T. H., Plarre, R., ... y Kaltenpoth, M. (2018). Ancient symbiosis confers desiccation resistance

- to stored grain pest beetles. *Molecular Ecology*, 27(8), 2095-2108.  
<https://doi.org/10.1111/mec.14418>
- Erper, I., Ak, K., Turkkan, M., Yildirim, E., Alkan, M. y Ozer, G. (2022). Potential of Turkish *Beauveria bassiana* isolates for the management of the polyphagous planthopper, *Orosanga japonica* Melichar 1898 (Hemiptera: Ricaniidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00604-9>
- Estrela, S., Kerr, B. y Morris, J. J. (2016). Transitions in individuality through symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*, 31, 191-198.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.007>
- Evison, S. E., Gallagher, J. D., Thompson, J. J., Siva-Jothy, M. T. y Armitage, S. A. (2017). Cuticular colour reflects underlying architecture and is affected by a limiting resource. *Journal of Insect Physiology*, 98, 7-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.11.005>
- Fan, H. W., Noda, H., Xie, H. Q., Suetsugu, Y., Zhu, Q. H. y Zhang, C. X. (2015). Genomic analysis of an ascomycete fungus from the rice planthopper reveals how it adapts to an endosymbiotic lifestyle. *Genome Biology and Evolution*, 7(9), 2623-2634. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv169>
- Farrell, B. D. y Mitter, C. (1994). Adaptive radiation in insects and plants: time and opportunity. *American Zoologist*, 34(1), 57-69.  
<https://doi.org/10.1093/icb/34.1.57>
- Feldhaar, H. (2011). Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology*, 36(5), 533-543.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x>
- Feldhaar, H. y Gross, R. (2008). Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection*, 10(9), 1082-1088.  
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.010>

- Fennah, R. G. (1955). Delphacidae from Juan Fernandez (Homoptera-Fulgoroidea). Proceeding Royal Entomological Society of London, (B)24: 129-137. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1955.tb01488.x>
- Fereres, A. y Moreno, A. (2009). Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus research*, 141(2), 158-168. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.10.020>
- Ferrari, S., Giuggia, J. y Oddino, C. (2018). Evaluación del efecto de insecticidas para tratamiento de semillas en maíz sobre el control del vector del virus del Mal de Río Cuarto. *Revista Científica FAV-UNRC, Ab Intus*, (2), 72-76.
- Ferrari, J. y Vavre, F. (2011). Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1569), 1389-1400. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0226>
- Ferrater, J. B., de Jong, P. W., Dicke, M., Chen, Y. H. y Horgan, F. G. (2013). Symbiont-mediated adaptation by planthoppers and leafhoppers to resistant rice varieties. *Arthropod-Plant Interactions*, 7, 591-605. <https://doi.org/10.1007/s11829-013-9277-9>
- Flórez, L. V., Biedermann, P. H., Engl, T. y Kaltenpoth, M. (2015). Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Natural Product Reports*, 32(7), 904-936. <https://doi.org/10.1039/C5NP00010F>
- Flórez, L. V. y Kaltenpoth, M. (2017). Symbiont dynamics and strain diversity in the defensive mutualism between *Lagria* beetles and *Burkholderia*. *Environmental Microbiology*, 19(9), 3674-3688.
- Flórez, L. V., Scherlach, K., Miller, I. J., Rodrigues, A., Kwan, J. C., Hertweck, C. y Kaltenpoth, M. (2018). An antifungal polyketide associated with

horizontally acquired genes supports symbiont-mediated defense in *Lagria villosa* beetles. *Nature Communications*, 9(1), 2478. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04955-6>

Fitzgerald, D. y Tipping, P. W. (2013). Effect of insect density and host plant quality on wing-form in *Megamelus scutellaris* (Hemiptera: Delphacidae). *Florida Entomologist*, 96(1), 124-130. <https://doi.org/10.1653/024.096.0116>

Forlani, L., Pedrini, N., Girotti, J. R., Mijailovsky, S. J., Cardozo, R. M., Gentile, A. G., ... y Juárez, M. P. (2015). Biological control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* combined with an aggregation cue: field, laboratory and mathematical modeling assessment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(5), e0003778. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003778>

Fox, J. y Weisberg, S. (2019). *An {R} Companion to Applied Regression*. 3rd ed. Sage, Thousand Oaks, CA.

Fukatsu, T. y Hosokawa, T. (2002). Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 389-396. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.389-396.2002>

Gao, X., Hu, X., Mo, F., Ding, Y., Li, M. y Li, R. (2022). Repellency Mechanism of Natural Guar Gum-Based Film Incorporated with Citral against Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 758. <https://doi.org/10.3390/ijms23020758>

Gerardo, N. M. y Parker, B. J. (2014). Mechanisms of symbiont-conferred protection against natural enemies: an ecological and evolutionary framework. *Current Opinion in Insect Science*, 4, 8-14.

<https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.08.002>

Ghaffar, M. B., Pritchard, J. y Ford-Lloyd, B. (2011). Brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) feeding behaviour on rice germplasm as an indicator of resistance. PLoS One, 6(7), e22137. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022137>

Gibson, C. M. y Hunter, M. S. (2010). Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. Ecology Letters, 13(2), 223-234. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01416.x>

Gil, R. y Latorre, A. (2019). Unity makes strength: a review on mutualistic symbiosis in representative insect clades. Life, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/life9010021>

Gill, T. A., Chu, C. y Pelz-Stelinski, K. S. (2017). Comparative proteomic analysis of hemolymph from uninfected and Candidatus *Liberibacter asiaticus*-infected *Diaphorina citri*. Amino Acids, 49, 389-406. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2373-2>

Giménez Pecci, M.P., Laguna, I.G. y Lenardón, S.L. (2012). Mal de Río Cuarto del maíz. En Giménez Pecci MP, Laguna IG, Lenardón SL (eds) Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina. INTA, Buenos Aires, Argentina, Cap IV, pp 41-56.

Glaser, R. W. (1946). The intracellular bacteria of the cockroach in relation to symbiosis. The Journal of Parasitology, 32(5), 483-489. <https://doi.org/10.2307/3272922>

Gonella, E., Orrù, B., Marasco, R., Daffonchio, D. y Alma, A. (2020). Disruption of host-symbiont associations for the symbiotic control and management of pentatomid agricultural pests - A Review. Frontiers in Microbiology, 11, 547031. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.547031>

- Gordon, J., Knowlton, N., Relman, D. A., Rohwer, F. y Youle, M. (2013). Superorganisms and holobionts. *Microbe*, 8(4), 152-153.
- Grevstad, F. S., Strong, D. R., Garcia-Rossi, D., Switzer, R. W. y Wecker, M. S. (2003). Biological control of *Spartina alterniflora* in Willapa Bay, Washington using the planthopper *Prokelisia marginata*: agent specificity and early results. *Biological Control*, 27(1), 32-42. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00181-0)
- Griffiths, G. W. y Beck, S. D. (1974). Effects of antibiotics on intracellular symbiotes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Cell and tissue research*, 148(3), 287-300. <https://doi.org/10.1007/BF00224257>
- Grijalva, O. y Giraldo, G. I. (2006). Simbiosis bacteriana en insectos. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 7(2):24-40. <https://core.ac.uk/download/pdf/11860838.pdf>
- Grilli, M. P. y Bruno, M. (2007). Regional abundance of a planthopper pest: the effect of host patch area and configuration. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122(2), 133-143. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00498.x>
- Grilli, M. P. y Gorla, D. E. (2002). Variación geográfica de la abundancia poblacional de *Delphacodes kuscheli* (Fennah) en la región central de Argentina. *Ecología Austral*, 12(2), 187-195. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ecoaus/v12n2/v12n2a12.pdf>
- Guerrero, R., Margulis, L. y Berlanga, M. (2013). Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *International Microbiology*, 16(3), 133-143. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.188>
- Gupta, A. y Nair, S. (2020). Dynamics of insect-microbiome interaction influence host and microbial symbiont. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1357. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01357>

- Gurung, K., Wertheim, B. y Falcao Salles, J. (2019). The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(3), 156-170. <https://doi.org/10.1111/eea.12768>
- Hansen, A. K. y Moran, N. A. (2013). The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Molecular Ecology*, 23(6), 1473-1496. <https://doi.org/10.1111/mec.12421>
- Hansen, A. K., Pers, D. y Russell, J. A. (2020). Symbiotic solutions to nitrogen limitation and amino acid imbalance in insect diets. En K. M. Oliver y J. A. Russell (Eds.). *Advances in Insect Physiology* (Vol. 58, pp. 161-205). Academic Press.
- Hao, Y., Dietrich, C. H. y Dai, W. (2016). Development of mouthparts in the cicada *Meimuna mongolica* (Distant): successive morphological patterning and sensilla differentiation from nymph to adult. *Scientific Reports*, 6(1), 38151. <https://doi.org/10.1038/srep38151>
- Harrison, X. A. (2014). Using observation-level random effects to model overdispersion in count data in ecology and evolution. *PeerJ*, 2, e616. <https://doi.org/10.7717/peerj.616>
- Hartig, F. (2022). DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level/Mixed) Regression Models. <https://cran.r-project.org/web/packages/DHARMA/vignettes/DHARMA.html>
- Hirota, B., Okude, G., Anbutsu, H., Futahashi, R., Moriyama, M., Meng, X. Y., ... y Fukatsu, T. (2017). A novel, extremely elongated, and endocellular bacterial symbiont supports cuticle formation of a grain pest beetle. *MBio*, 8(5), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.01482-17>
- Hongoh, Y. e Ishikawa, H. (1997). Uric acid as a nitrogen resource for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: studies with synthetic diets

- and aposymbiotic insects. *Zoological Science*, 14(4), 581-586.  
<https://doi.org/10.2108/zsj.14.581>
- Horgan, F. G., Arida, A., Ardestani, G. y Almazan, M. L. P. (2021). Elevated temperatures diminish the effects of a highly resistant rice variety on the brown planthopper. *Scientific Reports*, 11(1), 262.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80704-4>
- Horgan, F. G. y Ferrater, J. B. (2017). Benefits and potential trade-offs associated with yeast-like symbionts during virulence adaptation in a phloem-feeding planthopper. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 163(1), 112-125. <https://doi.org/10.1111/eea.12556>
- Horgan, F. G., Srinivasan, T. S., Naik, B. S., Ramal, A. F., Bernal, C. C., y Almazan, M. L. P. (2016). Effects of nitrogen on egg-laying inhibition and ovicidal response in planthopper-resistant rice varieties. *Crop Protection*, 89, 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.033>
- Hosokawa, T. y Fukatsu, T. (2020). Relevance of microbial symbiosis to insect behavior. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 91-100.  
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.03.004>
- Hosokawa, T., Hironaka, M., Mukai, H., Inadomi, K., Suzuki, N. y Fukatsu, T. (2012). Mothers never miss the moment: a fine-tuned mechanism for vertical symbiont transmission in a subsocial insect. *Animal Behaviour*, 83(1), 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.11.006>
- Hothorn, T., Bretz, F. y Westfall, P. (2022). *multcomp: Simultaneous Inference in General Parametric Models*. R package version X.X.  
<https://CRAN.R-project.org/package=multcomp>
- Hou, R.F. y Lee, Y.H. (1984). Effect of high-temperature treatment on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, with reference to physiological roles of its yeast-like symbiote. *Chinese Journal of*

Entomology, 4, 107–116.

Hou, Y., Ma, Z., Dong, S., Chen, Y. H. y Yu, X. (2013). Analysis of yeast-like symbiote diversity in the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* Stål, using a novel nested PCR-DGGE protocol. *Current Microbiology*, 67, 263-270. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0356-z>

Husnik, F. y Keeling, P. J. (2019). The fate of obligate endosymbionts: reduction, integration, or extinction. *Current Opinion in Genetics & Development*, 58, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.07.014>

lamba, K. y Dono, D. (2021). A review on brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål), a major pest of rice in Asia and Pacific. *Asian Journal of Research in Crop Science*, 6(4), 7-19. <https://doi.org/10.9734/ajrcs/2021/v6i430122>

Inchauregui, R. A., Tallapragada, K. y Parker, B. J. (2023). Aphid facultative symbionts confer no protection against the fungal entomopathogen *Batkoa apiculata*. *PLoS One*, 18(5), e0286095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286095>

Informe Técnico de Pioneer (2007). El Mal de Río Cuarto en Argentina, 1-8.

Jacobson, R. J., Chandler, D., Fenlon, J. y Russell, K. M. (2001). Compatibility of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin with *Amblyseius cucumeris* Oudemans (Acarina: Phytoseiidae) to control *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber plants. *Biocontrol Science and Technology*, 11(3), 391-400. <https://doi.org/10.1080/09583150120055808>

Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S. N., Boelio, L. M. y Perlman, S. J. (2010). Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Science*, 329, 212–215.

Janson, E. M., III Stireman, J. O., Singer, M. S. y Abbot, P. (2008).

- Phytophagous insect–microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. *Evolution*, 62(5), 997-1012.  
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00348.x>
- Kang, Y., Koo, H. N., Kim, H. K. y Kim, G. H. (2022). Analysis of the feeding behavior and life table of *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) under sublethal concentrations of imidacloprid and sulfoxaflor. *Insects*, 13(12), 1130.  
<https://doi.org/10.3390/insects13121130>
- Kanyile, S. N., Engl, T. y Kaltenpoth, M. (2022). Nutritional symbionts enhance structural defence against predation and fungal infection in a grain pest beetle. *Journal of Experimental Biology*, 225(1), jeb243593.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.243593>
- Kashima, T., Nakamura, T. y Tojo, S. (2006). Uric acid recycling in the shield bug, *Parastrachia japonensis* (Hemiptera: Parastrachiidae), during diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52(8), 816-825.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.05.003>
- Kassambara, A. y Kosinski, M. (2022). survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version X.X.  
<https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
- Kellner, R. L. (2001). Suppression of pederin biosynthesis through antibiotic elimination of endosymbionts in *Paederus sabaeus*. *Journal of Insect Physiology*, 47(4-5), 475-483.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00140-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00140-2)
- Kellner, R. L. (2002). Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabaeus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(4), 389-395. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00115-1)

- Kellner, R.L.L. y Dettner, K. (1996). Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecologia*, 107(3), 293–300. <https://doi.org/10.1007/BF00328445>
- Kiefer, J. S. T., Batsukh, S., Bauer, E., Hirota, B., Weiss, B., Wierz, J. C., ... y Engl, T. (2021). Inhibition of a nutritional endosymbiont by glyphosate abolishes mutualistic benefit on cuticle synthesis in *Oryzaephilus surinamensis*. *Communications Biology*, 4(1), 554. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02057-6>
- Kiefer, J. S. T., Bauer, E., Okude, G., Fukatsu, T., Kaltenpoth, M. y Engl, T. (2023). Cuticle supplementation and nitrogen recycling by a dual bacterial symbiosis in a family of xylophagous beetles. *The ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01415-y>
- Kikuchi, Y., Tada, A., Musolin, D. L., Hari, N., Hosokawa, T., Fujisaki, K. y Fukatsu, T. (2016). Collapse of insect gut symbiosis under simulated climate change. *MBio*, 7(5), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.01578-16>
- Klepzig, K. D., Adams, A. S., Handelsman, J. y Raffa, K. F. (2009). Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environmental Entomology*, 38(1), 67-77. <https://doi.org/10.1603/022.038.0109>
- Krishnaiah, N. V. (2014). A Global Perspective of Rice Brown Planthopper Management I --Crop-Climatic Requirement. *International Journal of Molecular Zoology*, 4(4). <https://doi.org/10.5376/ijmz.2014.04.0002>
- Kupper, M., Stigloher, C., Feldhaar, H. y Gross, R. (2016). Distribution of the obligate endosymbiont *Blochmannia floridanus* and expression analysis of putative immune genes in ovaries of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Arthropod Structure & Development*, 45(5), 475-487. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2016.09.004>

- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M. y Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Laguna, I. G., de Remes Lenicov, A. M., Virla, E. G., Avila, A. O., Pecci, M. P. G., Herrera, P., ... y Mariani, R. (2002). Difusión del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz, su vector, delfácidos asociados y huéspedes alternativos en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 61(1-2). <https://www.biotaxa.org/RSEA/article/view/31965>
- Latorre, A. y Manzano-Marín, A. (2017). Dissecting genome reduction and trait loss in insect endosymbionts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1389(1), 52-75. <https://doi.org/10.1111/nyas.13222>
- Lee, Y. H. y Hou, R. F. (1987). Physiological roles of a yeast-like symbiote in reproduction and embryonic development of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *Journal of Insect Physiology*, 33(11), 851-860. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90033-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90033-3)
- Lemoine, M. M., Engl, T. y Kaltenpoth, M. (2020). Microbial symbionts expanding or constraining abiotic niche space in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.01.003>
- Lenardón, S. L., March, G. J., Nome, S. F. y Ornaghi, J. A. (1998). Recent outbreak of “Mal de Río Cuarto” virus on corn in Argentina. *Plant Disease*, 82(4), 448-448. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.4.448C>
- Lenardón, S.L., Vallone, P., Marcellino, J., Giolitti, F., De Breuil, S. y Salomón, A. (2007). Comportamiento de híbridos comerciales de maíz frente al virus del mal de Río Cuarto en el área endémica 2006/2007. Informe de Actualización Técnica Maíz 5. EEA INTA Marcos Juárez, Argentina.

- Lenth, R. V., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Riebl, H. y Singmann, H. (2020). emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means, v1. 5.1. Vienna: R Core Team.
- Leybourne, D. J., Valentine, T. A., Bos, J. I. y Karley, A. J. (2020). A fitness cost resulting from *Hamiltonella defensa* infection is associated with altered probing and feeding behaviour in *Rhopalosiphum padi*. *Journal of Experimental Biology*, 223(1), jeb207936.
- Li, F., Hua, H., Ali, A. y Hou, M. (2019). Characterization of a bacterial symbiont *Asaia* sp. in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera*, and its effects on host fitness. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2179. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02179>
- Li, P., Li, F., Han, Y., Yang, L., Liao, X. y Hou, M. (2016). Asymmetric spread of SRBSDV between rice and corn plants by the vector *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *PLoS One*, 11(10), e0165014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165014>
- Li, T. P., Zhou, C. Y., Wang, M. K., Zha, S. S., Chen, J., Bing, X. L., ... y Hong, X. Y. (2022). Endosymbionts reduce microbiome diversity and modify host metabolism and fecundity in the planthopper *Sogatella furcifera*. *Msystems*, 7(2), e01516-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.01516-21>
- Liljeström, G.G., Brentassi, M. E. y Marino de Remes Lenicov, A. M. (2017). Modeling population dynamics of yeast-like symbionts (Ascomycota: Pyrenomycetes: Clavicipitaceae) of the planthopper *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae). *Symbiosis*, 72, 171-181. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0452-5>
- Liljeström, G. G. y Virla, E. G. (2004). Density-dependent parasitism of *Delphacodes kuscheli* eggs by *Anagrus flaveolus*: influence of egg patchiness and density. *Biocontrol Science and Technology*, 14(2), 107-115. <https://doi.org/10.1080/09583150310001638520>

- Lin, X., Gao, H., Xu, Y., Zhang, Y., Li, Y., Lavine, M. D. y Lavine, L. C. (2020). Cell cycle progression determines wing morph in the polyphenic insect *Nilaparvata lugens*. *iScience*, 23(4):101040. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101040>
- Liu, F., Li, X., Zhao, M., Guo, M., Han, K., Dong, X., ... y Hua, H. (2020). Ultrabithorax is a key regulator for the dimorphism of wings, a main cause for the outbreak of planthoppers in rice. *National Science Review*, 7(7), 1181-1189. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa061>
- Liu, X. D. y Zhang, A. M. (2013). High temperature determines the ups and downs of small brown planthopper *Laodelphax striatellus* population. *Insect Science*, 20(3), 385-392. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01533.x>
- Lu, H. L. y Leger, R. S. (2016). Insect immunity to entomopathogenic fungi. *Advances in Genetics*, 94, 251-285. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.002>
- Lu, Z. X. y Heong, K. L. (2009). Effects of nitrogen-enriched rice plants on ecological fitness of planthoppers. *Planthoppers: new threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia*, 247-256.
- Łukasik, P., van Asch, M., Guo, H., Ferrari, J. y Charles J. Godfray, H. (2013). Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. *Ecology Letters*, 16(2), 214-218. <https://doi.org/10.1111/ele.12031>
- Machado Assefh, C. R. y Alvarez, A. E. (2016). Probing behavior of aposymbiotic green peach aphid (*Myzus persicae*) on susceptible *Solanum tuberosum* and resistant *Solanum stoloniferum* plants. *Insect Science*, 25(1), 127-136. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12372>
- Machado Assefh, C. R., Lopez-Isasmendi, G., Tjallingii, W. F., Jander, G. y Alvarez, A. E. (2015). Disrupting *Buchnera aphidicola*, the

- endosymbiotic bacteria of *Myzus persicae*, delays host plant acceptance. *Arthropod-Plant Interactions*, 9, 529-541.  
<https://doi.org/10.1007/s11829-015-9394-8>
- March, G. J., Ornaghi, J. A., Beviacqua, J. E., Giuggia, J., Rago, A. y Lenardon, S. L. (2002). Systemic insecticides for control of *Delphacodes kuscheli* and the Mal de Río Cuarto virus on maize. *International Journal of Pest Management*, 48(2), 127-132. <https://doi.org/10.1080/09670870110100695>
- Margulis, L. (1990). Words as battle cries: symbiogenesis and the new field of endocytobiology. *Bioscience*, 40(9), 673-677.  
<https://doi.org/10.2307/1311435>
- Margulis, L. y Chapman, M. J. (1998). Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution. *Trends in Microbiology*, 6(9), 342-345.  
[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01325-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01325-0)
- Martin, E., Varotto Boccazzi, I., De Marco, L., Bongiorno, G., Montagna, M., Sacchi, L., ... y Epis, S. (2018). The mycobiota of the sand fly *Phlebotomus perniciosus*: involvement of yeast symbionts in uric acid metabolism. *Environmental Microbiology*, 20(3), 1064-1077.  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14044>
- Mascarin, G. M. y Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-26.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Masson, F. y Lemaitre, B. (2020). Growing ungrowable bacteria: Overview and perspectives on insect symbiont culturability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(4), 10-1128.  
<https://doi.org/10.1128/mnbr.00089-20>
- Mattson, W. J. (1980). Herbivory in relation to plant nitrogen content.

- Annual Review of Ecology and Systematics, 11(1), 119-161.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.001003>
- Mc Lean, D. L. y Kinsey, M. G. (1964). A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. *Nature*, 202(4939), 1358-1359.  
<https://doi.org/10.1038/2021358a0>
- Mc Lean, D. L. y Kinsey, M. G. (1967). Probing behavior of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. I. Definitive correlation of electronically recorded waveforms with aphid probing activities. *Annals of the Entomological Society of America*, 60(2), 400-405. <https://doi.org/10.1093/aesa/60.2.400>
- Meyling, N. V. y Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43(2), 145-155.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>
- Michalik, A., Franco, D. C., Deng, J., Szklarzewicz, T., Stroiński, A., Kobińska, M. y Łukasik, P. (2023). Variable organization of symbiont-containing tissue across planthoppers hosting different heritable endosymbionts. *Frontiers in Physiology*, 14, 471.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1135346>
- Miles, P. W. (1972). The saliva of Hemiptera. In *Advances in insect physiology* (Vol. 9, pp. 183-255). Academic Press.
- Miranda, M. P., Fereres, A., Appezzato-da-Gloria, B. y Lopes, J. R. S. (2009). Characterization of electrical penetration graphs of *Bucephalagonia xanthophis*, a vector of *Xylella fastidiosa* in citrus. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 130(1), 35-46.  
<https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00794.x>
- Mondal, S., Somani, J., Roy, S., Babu, A. y Pandey, A. K. (2023). Insect

- Microbial Symbionts: Ecology, Interactions, and Biological Significance. *Microorganisms*, 11(11), 2665. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112665>
- Montllor, C. B., Maxmen, A. y Purcell, A. H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27(2), 189-195. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.00393.x>
- Moran, N. A. (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(suppl\_1), 8627-8633. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611659104>
- Moran, N. A., McCutcheon, J. P. y Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, 42, 165-190. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119>
- Moran, N. A., Plague, G. R., Sandström, J. P. y Wilcox, J. L. (2003). A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(suppl\_2), 14543-14548. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135345100>
- Moran, N. A., Tran, P. y Gerardo, N. M. (2005). Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum *Bacteroidetes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8802-8810. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8802-8810.2005>
- Moussian, B. (2010). Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5), 363-375. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.03.003>
- Nakabachi, A., Ueoka, R., Oshima, K., Teta, R., Mangoni, A., Gurgui, M., ... y

- Fukatsu, T. (2013). Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. *Current Biology*, 23(15), 1478-1484. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.027>
- Nan, G. H., Xu, Y. P., Yu, Y. W., Zhao, C. X., Zhang, C. X. y Yu, X. P. (2016). Oocyte vitellogenesis triggers the entry of yeast-like symbionts into the oocyte of brown planthopper (Hemiptera: Delphacidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 109(5), 753-758. <https://doi.org/10.1093/aesa/saw025>
- Nault, L. R. y Ammar, E. D. (1989). Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annual Review of Entomology*, 34(1), 503-529. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.34.010189.002443>
- Nguyen, B., Than, A., Dinh, H., Morimoto, J. y Ponton, F. (2020). Parental microbiota modulates offspring development, body mass and fecundity in a polyphagous fruit fly. *Microorganisms*, 8(9), 1289. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091289>
- Noda, H. (1974). Preliminary histological observation and population dynamics of intracellular yeast-like symbiotes in the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Applied Entomology and Zoology*, 9(4), 275-277. <https://doi.org/10.1303/aez.9.275>
- Noda, H. y Koizumi, Y. (2003). Sterol biosynthesis by symbiotes: cytochrome P450 sterol C-22 desaturase genes from yeast-like symbiotes of rice planthoppers and anobiid beetles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(6), 649-658. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00056-0)
- Noda, H. y Saito, T. (1979). Effects of High temperature on the development of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) and on its intracellular yeast-like symbiotes. *Applied Entomology and Zoology*, 14, 64-75.

- Noda, H., Wada, K. Y Saito, T. (1979). Sterols in *Laodelphax striatellus* with special reference to the intracellular yeast-like symbiotes as a sterol source. *Journal of Insect Physiology*, 25(5), 443-447.  
[https://doi.org/10.1016/0022-1910\(79\)90012-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(79)90012-X)
- Oliver, K. M. y Perlman, S. J. (2020). Toxin-mediated protection against natural enemies by insect defensive symbionts. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 58, pp. 277-316). Academic Press.
- Ornaghi, J. A., Beviacqua, J. E., Aguirrezabala, D. A., March, G. J. y Lenardón, S. L. (1999). Detection of Mal de Río Cuarto virus in Uruguay. *Brazilian Phytopathology*, 24, 471.
- Ornaghi, J. A., March, G. J., Moschini, R. C., Martínez, M. I. y Boito, G. T. (2011). Predicting population level of *Delphacodes kuscheli*, vector of Mal de Río Cuarto virus, and climate risk in the Argentine Pampas using meteorological models. *Tropical Plant Pathology*, 36, 160-168.  
<https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000300004>
- Ownley, B. H., Pereira, R. M., Klingeman, W. E., Quigley, N. B. y Leckie, B. M. (2004). *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. *Emerging Concepts in Plant Health Management*, 255-269.
- Pais, R., Lohs, C., Wu, Y., Wang, J. y Aksoy, S. (2008). The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5965-5974.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00741-08>
- Pan, P. L., Ye, Y. X., Lou, Y. H., Lu, J. B., Cheng, C., Shen, Y., ... y Zhang, C. X. (2018). A comprehensive omics analysis and functional survey of cuticular proteins in the brown planthopper. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(20), 5175-5180.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1716951115>

- Pang, K., Dong, S., Hao, P., Chen, T., Wang, X., Yu, X. y Lin, H. (2020). Fungicides reduce the abundance of yeast-like symbionts and survival of white-backed planthopper *Sogatella furcifera* (Homoptera: Delphacidae). *Insects*, 11(4), 209. <https://doi.org/10.3390/insects11040209>
- Parker, B. J., Spragg, C. J., Altincicek, B. y Gerardo, N. M. (2013). Symbiont-mediated protection against fungal pathogens in pea aphids: a role for pathogen specificity?. *Applied and Environmental microbiology*, 79(7), 2455-2458. <https://doi.org/10.1128/AEM.03193-12>
- Patino-Navarrete, R., Piulachs, M. D., Belles, X., Moya, A., Latorre, A. y Peretó, J. (2014). The cockroach *Blattella germanica* obtains nitrogen from uric acid through a metabolic pathway shared with its bacterial endosymbiont. *Biology Letters*, 10(7), 20140407. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0407>
- Pedrini, N. (2018). Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. *Fungal Biology*, 122(6), 538-545. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.10.003>
- Pérez-Brocal, V., Latorre, A. y Moya, A. (2011). Symbionts and Pathogens: What is the Difference? In: Dobrindt, U., Hacker, J., Svanborg, C. (eds) *Between Pathogenicity and Commensalism. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/82\\_2011\\_190](https://doi.org/10.1007/82_2011_190)
- Pompon, J., Quiring, D., Goyer, C., Giordanengo, P. y Pelletier, Y. (2011). A phloem-sap feeder mixes phloem and xylem sap to regulate osmotic potential. *Journal of Insect Physiology*, 57(9), 1317-1322. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.06.007>

- Preap, V., Zalucki, M. P., Nesbitt, H. J. y Jahn, G. C. (2001). Effect of fertilizer, pesticide treatment, and plant variety on the realized fecundity and survival rates of Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae)-Generating outbreaks in Cambodia. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 4(1), 75-84. <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:60125>
- Prescott, L. M. (2002). *Microbiology*, Lansing M. Prescott. The McGraw-Hill.
- Presello, D. A., Eyherabide, G., Ferrer, M. y Celiz, A. (1996). Interacción Genotipo x ambiente en líneas de maíz respecto a su resistencia al Mal de Río Cuarto. Informe PROMARC, 85-97.
- Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S. y De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-1844200601200006](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-1844200601200006)
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. RFoundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. R versión 4.2.1.
- Raguraman, S. y Saxena, R. C. (1994). Effects of neem seed derivatives on brown planthopper symbiotes. *Phytoparasitica*, 22, 299-307. <https://doi.org/10.1007/BF02980531>
- Ramírez-Cáceres, G. E., Moya-Hernández, M. G., Quilodrán, M., Nespolo, R. F., Ceballos, R., Villagra, C. A. y Ramírez, C. C. (2019). Harboring the secondary endosymbiont *Regiella insecticola* increases predation risk and reproduction in the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Journal of Pest Science*, 92, 1039-1047. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01090-z>
- Ratzka, C., Gross, R. y Feldhaar, H. (2013). Gene expression analysis of the

endosymbiont-bearing midgut tissue during ontogeny of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Journal of Insect Physiology*, 59(6), 611-623. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.03.011>

Raven, J. A. (1983). Phytophages of xylem and phloem: a comparison of animal and plant sap-feeders. In *Advances in Ecological Research* (Vol. 13, pp. 135-234). Academic Press.

Remes Lenicov, A. M., Brentassi, M. E. y Toledo, A. V. (2008). Description of the immature stages of Fennah (Hemiptera: Delphacidae), vector of "Mal de Río Cuarto virus" on maize in Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 43(1), 25–33. <https://doi.org/10.1080/01650520701322701>

Remes Lenicov, A. M. y Paradell, S. (2012). Capítulo X: Morfología y biología de especies vectoras de virus y mollicutes al maíz en la Argentina (Insecta: Hemiptera: Cicadomorpha-Fulgoroidea). En: *Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina*. Ed: M. P. Giménez Pecci, Laguna, I.G., Lenardón, S. L. Buenos Aires, Ediciones INTA, 1ra. Ed, 125–152.

Remes Lenicov, A. M. y Tesón, A. (1978). Contribución al estudio de los fulgóricos argentinos I. (Homoptera, Fulgoroidea, Delphacidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 37(1-4): 17:22.

Remes Lenicov, A.M.M. y Virla, E. (1999). Delfácidos asociados al cultivo de maíz en la República Argentina (Insecta-Homoptera- Delphacidae). *Revista Argentina de Agronomía* 104:1-15. <http://revista-vieja.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/view/210>

Remes Lenicov, A. M., E. Virla y E. Dagoberto (1991). Cambios estacionales en la población del vector del "Mal de Río Cuarto" (*Delphacodes kuscheli* Fennah, 1955) en cultivos de avena y sus malezas circundantes en Sampacho, Córdoba (Insecta-Homoptera- Fulgoroidea). En: *Actas*

del Taller de actualización sobre Mal de Río Cuarto (ed INTA CIMMYT), pp. 116-129. EEA Pergamino. INTA, Buenos Aires, Argentina.

Remes Lenicov, A. M. , Virla, E., Tesón, A., Dagoberto, E. y Huguet, N. (1985). Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto en maíz. *Gaceta Agronómica* 5 (25): 251-258.

Remes Lenicov, A. M., Zerbino, S. y Demaría, M. (2000). Especies de delfácidos (Homoptera, Delphacidae) presentes en el cultivo de maíz, en Uruguay. *Agrociencia*, 4, 93-95.

Ren, X., Guo, R., Akami, M. y Niu, C. (2022). Nitrogen acquisition strategies mediated by insect symbionts: a review of their mechanisms, methodologies, and case studies. *Insects*, 13(1), 84. <https://doi.org/10.3390/insects13010084>

Rodríguez-Juárez, J. G., Bartlett, C. R., Pinedo-Escatel, J. A. y Moya-Raygoza, G. (2020). Diversity of planthoppers (Hemiptera: Delphacidae) on maize crops and edge grasses in Mexico. *Environmental Entomology*, 49(5), 1088-1095. <https://doi.org/10.1093/ee/nvaa085>

Rodríguez Pardina, P., Pecci, M. G., Laguna, I. G., Dagoberto, E. y Truol, G. (1998). Wheat: a new natural host for the Mal de Río Cuarto Virus in the endemic disease area, Río Cuarto, Córdoba province, Argentina. *Plant disease*, 82(2), 149-152. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.149>

Rosenblueth, M., Martínez-Romero, J., Ramírez-Puebla, S. T., Vera-Ponce de León, A., Rosas-Pérez, T., Bustamante-Brito, R., ... y Martínez-Romero, E. (2018). Endosymbiotic microorganisms of scale insects. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(1), 53-69. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.08.006>

Russell, J. A. y Moran, N. A. (2006). Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures.

Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 273(1586), 603-610. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3348>

Salem, H., Flórez, L., Gerardo, N. y Kaltenpoth, M. (2015). An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 282 (1804), 20142957. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2957>

Sánchez-Peña, S. R., Lara, J. S. J. y Medina, R. F. (2011). Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. Journal of Insect Science, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1673/031.011.0101>

Sandanayaka, M. R. M., Charles, J. G. y Froud, K. J. (2017). Potential use of electrical penetration graph (EPG) technology for biosecurity incursion response decision making. New Zealand Plant Protection, 70, 1-15. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2017.70.18>

Sandström, J. y Moran, N. (1999). How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? Entomologia Experimentalis et Applicata, 91(1):203–210. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1890-5\\_26](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1890-5_26)

Sapp, J. (2002). Paul Buchner (1886 - 1978) and hereditary symbiosis in insects. International Microbiology, 5(3), 145-150. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0079-7>

Sarria, E., Cid, M., Garzo, E. y Fereres, A. (2009). Excel Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. Computers and Electronics in Agriculture, 67(1-2), 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2009.02.006>

Sasaki, T., Kawamura, M. e Ishikawa, H. (1996). Nitrogen recycling in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: involvement of yeast-like

- endosymbionts in uric acid metabolism. *Journal of Insect Physiology*, 42(2), 125-129. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00086-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00086-0)
- Scarborough, C. L., Ferrari, J. y Godfray, H. C. J. (2005). Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310(5755), 1781-1781. <https://doi.org/10.1126/science.1120180>
- Seo, B. Y., Jung, J. K., Choi, B. R., Park, H. M., Lee, S. W. y Lee, B. H. (2010). Survival rate and stylet penetration behavior of current Korean populations of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, on resistant rice varieties. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2009.09.001>
- Seo, B. Y., Kwon, Y. H., Jung, J. K. y Kim, G. H. (2009). Electrical penetration graphic waveforms in relation to the actual positions of the stylet tips of *Nilaparvata lugens* in rice tissue. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12(2), 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2009.02.002>
- Shah, F. A., Ansari, M. A., Watkins, J., Phelps, Z., Cross, J. y Butt, T. M. (2009). Influence of commercial fungicides on the germination, growth and virulence of four species of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 19(7), 743-753. <https://doi.org/10.1080/09583150903100807>
- Shentu, X. P., Li, D. T., Xu, J. F., She, L. y Yu, X. P. (2016). Effects of fungicides on the yeast-like symbiotes and their host, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 128, 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.10.010>
- Shentu, X.P., Wang, X., Xiao, Y. y Yu, X. (2019). Effects of fungicide propiconazole on the yeast-like symbiotes in brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens* (Stål) and its role in controlling BPH infestation. *Frontiers in Physiology*, 10, 89. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00089>

- Shi, J., Song, Y., Shentu, X. y Yu, X. (2021). Antimicrobials affect the fat body microbiome and increase the brown planthopper mortality. *Frontiers in Physiology*, 12, 644897. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.644897>
- Sinno, M., Bézier, A., Vinale, F., Giron, D., Laudonia, S., Garonna, A. P. y Pennacchio, F. (2020). Symbiosis disruption in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi), as a potential tool for sustainable control. *Pest Management Science*, 76(9), 3199-3207. <https://doi.org/10.1002/ps.5875>
- Sinotte, V. M., Freedman, S. N., Ugelvig, L. V. y Seid, M. A. (2018). *Camponotus floridanus* ants incur a trade-off between phenotypic development and pathogen susceptibility from their mutualistic endosymbiont *Blochmannia*. *Insects*, 9(2), 58. <https://doi.org/10.3390/insects9020058>
- Siva-Jothy, M. T., Moret, Y. y Rolff, J. (2005). Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Advances in Insect Physiology*, 32, 1-48. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(05\)32001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(05)32001-7)
- Skidmore, I. H. y Hansen, A. K. (2017). The evolutionary development of plant-feeding insects and their nutritional endosymbionts. *Insect Science*, 24(6), 910-928. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12463>
- Skrzecz, I., Popowska-Nowak, E., Wolski, R., Sowińska, A., Jabłoński, T., Pezowicz, E., ... y Przewłoka, I. (2016). The role of fungus *Beauveria bassiana* in reducing the number of *Pissodes castaneus* (Col., Curculionidae) in young forests. *Folia Forestalia Polonica*, 58(4), 214-219. <https://doi.org/10.1515/ffp-2016-0024>
- Smith, D. F., Camacho, E., Thakur, R., Barron, A. J., Dong, Y., Dimopoulos, G., ... y Casadevall, A. (2021). Glyphosate inhibits melanization and increases susceptibility to infection in insects. *PLoS biology*, 19(5), e3001182. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001182>

- Sõgawa, K. (1982). The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. *Annual Review of Entomology*, 27(1), 49-73. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.27.010182.000405>
- Sõgawa, K. y Cheng, C. H. (1979). Economic thresholds, nature of damage, and losses caused by the brown planthopper. *Brown planthopper: Threat to rice production in Asia*, 125-142.
- Sosa, A. J., Cordo, H. A. y Sacco, J. (2007). Preliminary evaluation of *Megamelus scutellaris* Berg (Hemiptera: Delphacidae), a candidate for biological control of waterhyacinth. *Biological Control*, 42(2), 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.04.012>
- Steinkraus, D. C. (2007). Documentation of naturally occurring pathogens and their impact in agroecosystems. In *Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests* (pp. 267-281). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4020-5933-9.pdf#page=274>
- Sudakaran, S., Kost, C. y Kaltenpoth, M. (2017). Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation. *Trends in Microbiology*, 25(5), 375-390. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.014>
- Sudakaran, S., Retz, F., Kikuchi, Y., Kost, C., y Kaltenpoth, M. (2015). Evolutionary transition in symbiotic syndromes enabled diversification of phytophagous insects on an imbalanced diet. *The ISME Journal*, 9(12), 2587-2604. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.75>
- Suh, S. O., Noda, H. y Blackwell, M. (2001). Insect symbiosis: derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic filamentous lineage. *Molecular Biology and Evolution*, 18(6), 995-1000. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003901>

- Tang, H., Kambris, Z., Lemaitre, B. y Hashimoto, C. (2006). Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(38), 28097-28104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601642200>
- Therneau, T. M. (2022). coxme: Mixed Effects Cox Models. R package version 2.2-16. <https://cran.r-project.org/web/packages/coxme/index.html>
- Tipton, L., Darcy, J. L. y Hynson, N. A. (2019). A developing symbiosis: enabling cross-talk between ecologists and microbiome scientists. *Frontiers in Microbiology*, 10, 292. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00292>
- Tjallingii, W. F. EPG Systems. <https://www.epgsystems.eu/>
- Tjallingii, W. F. (1978). Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24(3), 721-730. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1978.tb02836.x>
- Tjallingii, W. F. (1985). Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 38(2), 177-186. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1985.tb03516.x>
- Toledo, A.V. (2006). Hongos patógenos de hemípteros auquenorrincos plaga de cultivos agrícolas. Evaluación de su capacidad biocida como agentes de control. Tesis doctoral. <https://doi.org/10.35537/10915/4464>
- Toledo, A. V., Alippi, A. M. y Remes Lenicov, A. M. M. (2011). Growth inhibition of *Beauveria bassiana* by bacteria isolated from the cuticular surface of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* and the planthopper, *Delphacodes kuscheli*, two important vectors of maize pathogens. *Journal of Insect Science*, 11(1), 29. <https://doi.org/10.1673/031.011.0129>
- Toledo, A. V. y Manfrino, R. G. (2019). Hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha y Sternorrhyncha perjudiciales para la agricultura en

- la Argentina. En C. C. López Lastra y R. E. Leucona(Eds.), Micopatología de artrópodos: hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas (1ra ed. pp 121-150). INTA
- Toledo, A. V., Remes Lenicov, A. M. y López Lastra, C. C. (2007). Pathogenicity of fungal isolates (Ascomycota: Hypocreales) against *Peregrinus maidis*, *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae), and *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), vectors of corn diseases. *Mycopathologia*, 163, 225-232. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9006-y>
- Torricono, A. K., Ruiz Posse, A., Ferrer, M., Colella, E. ... y Guerra, G. D. (2022). Comportamiento de los principales híbridos de maíz en ambientes de Córdoba frente a dos enfermedades transmitidas por vectores. Campaña 2021/22. XVII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. UNNOBA.
- Truol, G. A., Usugi, T., Hirao, J., Arneodo, J. D., Giménez Pecci, M. y Laguna, I. G. (2001). Transmisión experimental del virus del Mal de Río Cuarto por *Delphacodes kuscheli*. *Fitopatologia Brasileira*, 26, 39-44. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000100007>
- Tsuchida, T., Koga, R. y Fukatsu, T. (2004). Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303(5666), 1989-1989. <https://doi.org/10.1126/science.1094611>
- Uma Devi, K., Padmavathi, J., Uma Maheswara Rao, C., Khan, A. A. P. y Mohan, M. C. (2008). A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocontrol Science and Technology*, 18(10), 975-989. <https://doi.org/10.1080/09583150802450451>
- Urban, J. M. y Cryan, J. R. (2012). Two ancient bacterial endosymbionts have coevolved with the planthoppers (Insecta: Hemiptera: Fulgoroidea). *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 1-19. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/12/87>

- Valero-Jiménez, C. A., Wieggers, H., Zwaan, B. J., Koenraad, C. J. y van Kan, J. A. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.011>
- Valovage, W. D. y Brooks, M. A. (1979). Uric acid quantities in the fat body of normal and aposymbiotic German cockroaches, *Blattella germanica*. *Annals of the Entomological Society of America*, 72(5), 687-689. <https://doi.org/10.1093/aesa/72.5.687>
- van den Bosch, T. J. y Welte, C. U. (2017). Detoxifying symbionts in agriculturally important pest insects. *Microbial Biotechnology*, 10(3), 531-540. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12483>
- Vega, F. E. y Dowd, P. F. (2005). The role of yeasts as insect endosymbionts. En: Vega, F.E. Blackwell, M. (Eds). *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*.(pp. 211-243). Oxford University Press, New York. <https://doi.org/10.1093/oso/9780195166521.003.0009>
- Vera-Ponce de León, A., Sanchez-Flores, A., Rosenblueth, M. y Martínez-Romero, E. (2016). Fungal community associated with *Dactylopius* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) and its role in uric acid metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 7, 954. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00954>
- Virla, E.G. (2004). Biología de *Gonatopus bonaerensis* (Hymenoptera: Drynidae), enemigo natural de Delphacidae (Hemiptera) en Argentina. *Revista Facultad Agronomía* 105: 18–26. <http://revista-vieja.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/view/184>
- Virla, E.G. y Remes Lenicov, A.M.M. (1991). Ciclo de vida de *Delphacodes kuscheli* criado sobre diferentes hospedantes en condiciones de laboratorio (Insecta: Homoptera: Delphacidae). En: *Actas del Taller de actualización sobre Mal de Río Cuarto* (ed INTA CIMMYT), pp. 104–115.

EEA Pergamino. INTA, Buenos Aires, Argentina.

- Vorburger, C. y Perlman, S. J. (2018). The role of defensive symbionts in host-parasite coevolution. *Biological Reviews*, 93(4), 1747-1764. <https://doi.org/10.1111/brv.12417>
- Wan, G., Jiang, S., Wang, W., Li, G., Tao, X., Pan, W., ... y Chen, F. (2015). Rice stripe virus counters reduced fecundity in its insect vector by modifying insect physiology, primary endosymbionts and feeding behavior. *Scientific Reports*, 5(1), 12527. <https://doi.org/10.1038/srep12527>
- Wan, P. J., Yang, L., Wang, W. X., Fan, J. M., Fu, Q. y Li, G. Q. (2014). Constructing the major biosynthesis pathways for amino acids in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae), based on the transcriptome data. *Insect Molecular Biology*, 23(2), 152-164. <https://doi.org/10.1111/imb.12069>
- Wang, J. J., Tsai, J. H. y Broschat, T. K. (2006). Effect of nitrogen fertilization of corn on the development, survivorship, fecundity and body weight of *Peregrinus maidis* (Hom., Delphacidae). *Journal of Applied Entomology*, 130(1), 20-25. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2005.01030.x>
- Wang, L., Shi, P., Chen, C. y Xue, F. (2013). Effect of temperature on the development of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(1), 107-114. <https://doi.org/10.1603/EC12364>
- Wang, Y., Tang, M., Hao, P., Yang, Z., Zhu, L. y He, G. (2008). Penetration into rice tissues by brown planthopper and fine structure of the salivary sheaths. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129(3), 295-307. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00785.x>
- Wang, Z., Yong, H., Zhang, S., Liu, Z. y Zhao, Y. (2023). Colonization resistance of symbionts in their insect hosts. *Insects*, 14(7), 594.

<https://doi.org/10.3390/insects14070594>

Wang, Z. L., Wang, T. Z., Zhu, H. F., Pan, H. B. y Yu, X. P. (2020). Diversity and dynamics of microbial communities in brown planthopper at different developmental stages revealed by high-throughput amplicon sequencing. *Insect Science*, 27(5), 883-894.

<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12729>

Wetzel, J. M., Ohnishi, M., Fujita, T., Nakanishi, K., Naya, Y., Noda, H. y Sugiura, M. (1992). Diversity in steroidogenesis of symbiotic microorganisms from planthoppers. *Journal of Chemical Ecology*, 18, 2083-2094.

<https://doi.org/10.1007/BF00981929>

Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., ...y Dunnington, D. (2020). ggplot2: Create elegant data visualisations using the grammar of graphics.

Wilkinson, T. L. y Douglas, A. E. (1995). Aphid feeding, as influenced by disruption of the symbiotic bacteria: an analysis of the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Journal of Insect Physiology*, 41(8), 635-640.

[https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00036-T](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00036-T)

Wilkinson, T. L. e Ishikawa, H. (2001). On the functional significance of symbiotic microorganisms in the Homoptera: a comparative study of *Acyrtosiphon pisum* and *Nilaparvata lugens*. *Physiological Entomology*, 26(1), 86-93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2001.00214.x>

Wilson, B. E. (2019). Hemipteran pests of sugarcane in North America. *Insects*, 10(4), 107. <https://doi.org/10.3390/insects10040107>

Wilson, S. W. (2005). Keys to the families of Fulgoromorpha with emphasis on planthoppers of potential economic importance in the southeastern United States (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Florida Entomologist*, 88(4), 464-481.

[https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2005\)88\[464:KTTFOF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2005)88[464:KTTFOF]2.0.CO;2)

Wilson, A. C. y Duncan, R. P. (2015). Signatures of host/symbiont genome coevolution in insect nutritional endosymbioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10255-10261. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423305112>

Wittkopp, P. J. y Beldade, P. (2009). Development and evolution of insect pigmentation: genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 20, No. 1, pp. 65-71). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.10.002>

Xie, J., Butler, S., Sanchez, G. y Mateos, M. (2014). Male killing *Spiroplasma* protects *Drosophila melanogaster* against two parasitoid wasps. *Heredity*, 112(4), 399-408. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.118>

Xie, J., Vilchez, I. y Mateos, M. (2010). *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *PLoS One*, 5(8), e12149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012149>

Xue, J., Zhou, X., Zhang, C. X., Yu, L. L., Fan, H. W., Wang, Z., ... y Cheng, J. A. (2014). Genomes of the rice pest brown planthopper and its endosymbionts reveal complex complementary contributions for host adaptation. *Genome Biology*, 15(12), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0521-0>

Yang, L., Han, Y., Li, P., Wen, L. y Hou, M. (2017). Silicon amendment to rice plants impairs sucking behaviors and population growth in the phloem feeder *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Scientific reports*, 7(1), 1101. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01060-4>

Ying, L., Baiming, L., Hongran, L., Tianbo, D., Yunli, T. y Dong, C. (2021). Effect of *Cardinium* infection on the probing behavior of *Bemisia tabaci*

- (Hemiptera: Aleyrodidae) MED. Journal of Insect Science, 21(3), 13.  
<https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab040>
- Zera, A. J. y Denno, R. F. (1997). Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. Annual Review of Entomology, 42(1), 207-230.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.207>
- Zhang, F., Li, X., Zhang, Y., Coates, B., Zhou, X. J. y Cheng, D. (2015a). Bacterial symbionts, *Buchnera*, and starvation on wing dimorphism in English grain aphid, *Sitobion avenae* (F.)(Homoptera: Aphididae). Frontiers in Physiology, 6, 155. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00155>
- Zhang, J., He, Y. y Chen, J. (2015b). Effects of nystatin on the feeding behavior, nutrition and yeast-like symbiont number of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). Acta Phytophylacica Sinica, 42(2), 264-270.
- Zhang, J. H., Yu, N., Xu, X. X. y Liu, Z. W. (2019). Community structure, dispersal ability and functional profiling of microbiome existing in fat body and ovary of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Insect Science, 26(4), 683-694. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12575>
- Zhang, X. J., Yu, X. P. y Chen, J. M. (2008). High temperature effects on yeast-like endosymbionts and pesticide resistance of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. Rice Science, 15(4), 326-330.  
[https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(09\)60011-1](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(09)60011-1)
- Zhao, R., Li, D., Wang, X., Li, Z., Yu, X. y Shentu, X.P. (2022). Synergistic and Additive interactions of zhongshengmycin to the chemical insecticide pymetrozine for controlling *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). Frontiers in Physiology, 13, 875610.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.875610>
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi

*Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553-596.  
<https://doi.org/10.1080/09583150701309006>

Zytynska, S. E., Tighiouart, K. y Frago, E. (2021). Benefits and costs of hosting facultative symbionts in plant-sucking insects: A meta-analysis. *Molecular Ecology*, 30(11), 2483-2494. <https://doi.org/10.1111/mec.15897>