



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Museo**



# **Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate *Ilex paraguariensis* en la provincia de Misiones**

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales

**Lic. María Elena Schapovaloff**

Directora: Dra. Claudia López Lastra

Co-director: Dr. Luis Francisco Alves

La Plata, 2012

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Titulo: “Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate *Ilex paraguariensis* en la provincia de Misiones”

Grado a obtener: Doctor en Ciencias Naturales

Tesista: Lic. Maria Elena Schapovaloff

Directora: Dra. Claudia Cristina López Lastra

Co-Director: Dr. Luis Francisco Alves

*A mi madre Josefa por su gran amor,  
apoyo incondicional y comprensión.*

## AGRADECIMIENTOS

- ◆ A la Dra. Claudia López Lastra por ser una gran orientadora, por su apoyo en la realización de este trabajo de investigación, al igual que por su amistad, dedicación y respaldo en todo momento.
- ◆ A la Dra. Martha Medvedeff que en su momento fue mi co-directora de tesis, por su colaboración y conocimiento profesional.
- ◆ Al Dr. Luis Alves por ayudarme, orientarme y acompañarme en mi proyecto de investigación y en mi estadía en la ciudad de Cascavel, Brasil.
- ◆ Al Dr. Juan García por su orientación en los aspectos de la investigación científica.
- ◆ A mis compañeros del laboratorio de Micología de la FCEQyN-UNaM: Celina Vedoya, Beda Mereles, Miriam Chade, Any Señuk, Gustavo Bich, Ana Thea, Belén Jaquet, Vanesa Sosa, Ernesto Velazquez, Cecilia Villalba, Andrea Sánchez y Liliana Benítez por tantos momentos compartidos.
- ◆ A mis compañeros del laboratorio del CEPAVE: Celeste D' Alessandro, Alejandra Gutiérrez, Belén Cabrera, Silvana Tongiani, Romina Manfrino, Evangelina Muttis, Manuel Páramo Rueda, Julieta Tornesello y Patricia Albornoz Medina, por estar siempre disponibles cuando necesite y principalmente por la amistad.
- ◆ A mis compañeros del laboratorio de la UNIOESTE, Cascavel, Brasil: Jéssica Cavalcanti, Marina Formentini, André Fanti, Roger Da Silva, Emanuele Kessler, Ana Mamprin, Patricia, Daian Pinto de Oliveira, Elisangela Rodrigues, Aline, Andreia Bonini, Rafaela Barbosa, Thiago, Nicole Holz y Victor, por ayudarme con los ensayos en laboratorio y compartir momentos inolvidables durante mi estadía en Cascavel, Brasil.
- ◆ A los productores y profesionales que me permitieron efectuar el relevamiento y muestreo en sus cultivos de yerba mate.
- ◆ A los Ing. Agrónomos Oscar Pérez y Valentín Llera, por colaborar con los muestreos.
- ◆ A las Cooperativas yerbateras de Jardín América y Ruiz de Montoya (Misiones) y a la Cooperativa yerbatera de Colonia Liebig (Corrientes), por su ayuda con los muestreos en los yerbales.

- ◆ A la fazenda Vila Nova (Ivaí, Paraná, Brasil) por la disponibilidad y la ayuda en la recolección de los taladros de la yerba mate.
- ◆ Al Dr. Richard Humber por su colaboración con la identificación de los aislamientos fúngicos.
- ◆ A la Ing. Agr. María Inés Urrutia y al Dr. Raúl Alzogaray por la realización y colaboración con los análisis estadísticos.
- ◆ Al técnico de biología molecular del CEPAVE Dr. Javier Panei por su ayuda y colaboración.
- ◆ A la Dra. Noelia Guzmán por su colaboración con el análisis de las secuencias y filogenia molecular.
- ◆ A los profesionales y directivos de las Colecciones Micológicas del CEPAVE por permitir el ingreso de mis aislamientos fúngicos y llevar a cabo la preservación de los mismos.
- ◆ A la directora del CEPAVE, Dra. Alda González, y a la co-directora, Dra. Graciela Navone, por haberme permitido realizar mis tareas de investigación en dicho centro.
- ◆ A todos los integrantes del CEPAVE que de una u otra manera me ayudaron y compartieron conmigo el desarrollo de las tareas de investigación.
- ◆ A los miembros de la UNLP y CONICET por financiar mi tesis doctoral y permitir mi formación científica.
- ◆ A mi familia, en especial a mis padres, hermano, sobrina, tíos y primos, por el cariño y confianza que me brindan en todo momento, respaldándome para alcanzar mis objetivos.
- ◆ A todos mis amigos que siempre me apoyaron con su amistad sincera.
- ◆ A Dios por darme fortaleza, permitirme alcanzar una meta más en la vida y por guiarme por el camino de la felicidad.
- ◆ A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron para hacer posible la realización de este trabajo.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>ANTECEDENTES</b> .....	11
1.1. Yerba Mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.).....	11
1.2. Plagas de la Yerba Mate .....	12
1.3. <i>Hedypathes betulinus</i> (Klug, 1825).....	13
1.3.1. Biología de <i>H. betulinus</i> .....	13
1.3.2. Fluctuación poblacional de <i>H. betulinus</i> .....	15
1.4. <i>Gyropsylla spegazziniana</i> (Lieber, 1919).....	16
1.4.1. Biología de <i>G. spegazziniana</i> .....	16
1.4.2. Fluctuación poblacional de <i>G. spegazziniana</i> .....	18
1.5. Manejo Integrado de Plagas en Yerba Mate.....	19
1.5.1. Control cultural.....	20
1.5.2. Control químico.....	21
1.5.3. Control físico .....	22
1.5.4. Control biológico.....	22
1.6. Hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano de plagas de la yerba mate.....	23
1.7. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos .....	24
1.7.1. Adhesión de los propágulos infectivos a la cutícula del insecto .....	25
1.7.2. Germinación de los propágulos infectivos .....	25
1.7.3. Penetración del tegumento.....	26
1.7.4. Multiplicación del hongo en el hemocele y muerte del insecto .....	26
1.7.5. Emersión del hongo y dispersión de los propágulos infectivos.....	27
1.8. Mecanismo de defensa de los insectos .....	27
1.8.1. Barreras físico-químicas .....	28
1.8.2. Sistema inmune innato.....	28
1.8.3. Otras estrategias de defensa.....	29
1.9. Caracterización e identificación de hongos entomopatógenos.....	30

1.10. Característica de la especie <i>Beauveria bassiana</i> .....	33
1.11. Característica de la especie <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	33
1.12. Características de la especie <i>Purpureocillium lilacinum</i> .....	34
1.13. Factores que influyen en el establecimiento y acción de hongos entomopatógenos .....	34
1.13.1. Humedad Relativa (HR) .....	35
1.13.2. Temperatura (T).....	35
1.13.3. Radiación solar (RS).....	36
1.13.4. Suelo .....	36
1.13.5. Los agroquímicos y su efecto sobre los entomopatógenos.....	36
1.14. Los hongos entomopatógenos como agentes potenciales de control biológico ....	37
1.15. Inóculos de hongos entomopatógenos en el suelo.....	39
<b>HIPÓTESIS:</b> .....	42
<b>OBJETIVO GENERAL:</b> .....	42
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b> .....	42
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	44
2.1. Área de Estudio .....	44
2.2. Frecuencia de muestreo .....	47
2.3. Recolección de insectos y detección de infecciones .....	47
2.4. Aislamiento de los hongos entomopatógenos .....	48
2.4.1. Aislamiento a partir del insecto infectado .....	48
2.4.2. Aislamiento monospórico a partir de muestras de suelo .....	48
2.5. Procedimientos con cultivos fúngicos .....	50
2.5.2 Determinación del crecimiento radial y tasa de crecimiento.....	51
2.6. Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por caracteres morfológicos.....	52
2.6.1. Descripción macroscópica.....	53
2. 6.2. Descripción microscópica.....	53
2.6.3. Análisis estadísticos.....	53
2.7. Preservación de los cultivos fúngicos.....	53
2.7.1. En glicerol 10 % estéril .....	54
2.7.2. En agua destilada estéril .....	54

2.7.3. En papel de filtro esterilizado .....	54
2.7.4. Transferencias en cultivo o “repiques” sucesivos .....	54
2.7.5. En sílica gel .....	55
2.8. Cría de insectos para Bioensayos .....	55
2.8.1. <i>Hedypathes betulinus</i> (Coleoptera: Cerambycidae) .....	55
2.8.2. <i>Gyropsylla spegazziniana</i> (Hemiptera: Psyllidae) .....	56
2.9. Ensayos de patogenicidad con hongos entomopatógenos realizados contra <i>H. betulinus</i> .....	57
2.9.1. Ensayos realizados con <i>H. betulinus</i> .....	57
2.9.2. Diseño experimental y obtención del inóculo .....	58
2.9.3. Tratamiento post inoculativo realizado en los ensayos de patogenicidad....	59
2.9.4. Análisis estadísticos.....	59
2.10. Ensayos de patogenicidad con hongos entomopatógenos realizados contra <i>G.</i> <i>spegazziniana</i> .....	60
2.10.1. Ensayos realizados con <i>G.spegazziniana</i> .....	60
2.10.2. Diseño experimental y obtención del inóculo .....	60
2.10.3. Tratamiento post inoculativo realizado en los ensayos de patogenicidad..	62
2.10.4. Análisis estadísticos.....	62
2.11. Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por medio de técnicas moleculares .....	63
2.11.1. Preparación del material fúngico .....	63
2.11.2. Extracción del ADN genómico .....	63
2.11.3. Cuantificación del ADN .....	64
2.11.4. Amplificación del ADNr por PCR .....	64
2.11.5. Secuenciación y análisis filogenético .....	66
<b>RESULTADOS</b> .....	68
<b>Prospección, aislamiento, caracterización e identificación de hongos patógenos en insectos plaga de la yerba mate</b> .....	68
3.1.1. Relevamiento de individuos de <i>H. betulinus</i> y <i>G. spegazziniana</i> y hongos entomopatógenos.....	68
3.1.2. Prospección de hongos patógenos de <i>H. betulinus</i> y <i>G. spegazziniana</i> .....	68

3.1.3. Aislamiento monospórico e identificación de hongos entomopatógenos a partir de muestras de suelo .....	69
3.1.4. Caracterización morfológica de los hongos patógenos aislados de suelo de cultivos de yerba mate .....	74
<b>Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos sobre individuos de <i>H. betulinus</i> “Taladro de la yerba mate” .....</b>	<b>90</b>
3.2.1. Selección de los aislamientos fúngicos para las pruebas de patogenicidad de hongos Hypocreales contra <i>H. betulinus</i> .....	90
3.2.2. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos seleccionados	91
<b>Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos sobre individuos de <i>G. spgazziniana</i> “Rulo de la yerba mate” .....</b>	<b>98</b>
3.3.1. Selección de los aislamientos fúngicos para las pruebas de patogenicidad de hongos Hypocreales contra <i>G. spgazziniana</i> .....	98
3.3.2. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos seleccionados	99
3.4.1. Caracterización molecular de los aislamientos de <i>B. bassiana</i> aislados de suelo de cultivos de yerba mate .....	102
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>119</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>153</b>

## RESUMEN

La República Argentina es el primer productor mundial de “yerba mate” *Ilex paraguariensis* (St. Hil.), el 90% de la producción nacional se cultiva en la provincia de Misiones y el 10% restante en la región correntina que limita con ella. Las principales especies plaga de este cultivo en la provincia de Misiones son: *Hedypathes betulinus* (Klug) (Coleoptera: Cerambycidae) popularmente conocido como “taladro o tigre de la yerba mate” y *Gyropsylla spegazziniana* (Liezer) (Hemiptera: Psyllidae) “rulo o psilido de la yerba mate”.

Los métodos de control más utilizados para estos insectos plaga de la yerba mate son el control cultural y el control químico. El control cultural para *H. betulinus* consiste en la colecta manual de los adultos como así también la poda y el desmalezamiento dejando fajas de vegetación secundaria entre las líneas de las plantas de yerba mate favoreciendo la visualización del insecto y eliminación de las regiones de preferencia de abrigo, exponiéndolos a la insolación y acción de predadores. Para el control de *G. spegazziniana* se realiza la poda de los brotes atacados, que también son necesarios para mantener el vigor, la forma y la calidad de las plantas. El control químico para ambas especies plaga consiste en la aplicación de insecticidas, sin embargo, este tipo de manejo no es indicado, ya que existe la posibilidad de dejar residuos, pudiendo acarrear riesgos de intoxicación a los consumidores, debido a que la yerba mate se consume prácticamente *in natura*. En las últimas décadas se ha incrementado el interés en el manejo integrado de plagas (MIP) cuyo fundamento es la integración de diferentes estrategias de control para reducir al mínimo el uso de plaguicidas químicos. Este tipo de manejo contempla la utilización de patógenos, parásitos y depredadores para el control de insectos plaga, lo que ha promovido la búsqueda y el estudio de organismos entomopatógenos como virus, bacterias, protozoos y hongos, para ser utilizados en programas de control de insectos perjudiciales. Entre los microorganismos utilizados para el control biológico, los hongos constituyen un importante grupo de patógenos de insectos y otros artrópodos plaga. Estos hongos son considerados excelentes candidatos como agentes de control biológico, ya que pueden infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula, presentan

dispersión activa y pasiva, persistencia en el medio, tolerancia a factores adversos debido al desarrollo de esporas de resistencia, y su manipulación en cultivos *in vitro* es relativamente fácil. En la Argentina existen varias referencias sobre la presencia y el uso de hongos patógenos de insectos plaga, sin embargo, no existen estudios referentes a los hongos patógenos de los insectos plaga de la yerba mate. En base a este contexto se decidió plantear como objetivo general el estudio de la diversidad y patogenicidad de hongos patógenos de insectos plaga de la yerba mate en la región del Noreste Argentino.

Se realizó una prospección de adultos y estados juveniles de *H. betulinus* y *G. spegazziniana* en el período comprendido entre mayo de 2008 y septiembre de 2010 con una frecuencia de una vez cada 15 días, en diferentes localidades de la provincia de Misiones. Como resultado de estos sucesivos muestreos no se observaron infecciones fúngicas evidentes en campo, así como tampoco luego del período de mantención de los insectos en laboratorio. En diferentes cultivos de yerba mate orgánico y convencional de la provincia de Misiones, se recolectaron 40 muestras de suelo, como resultado de estos sucesivos muestreos pudieron obtenerse 29 aislamientos *in vitro* de hongos entomopatógenos, los hongos se ubicaron taxonómicamente en el Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales, de los cuales 17 fueron identificados como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., 2 como *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. y 10 como *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Hywel-Jones & Samsom.

Se evaluó la patogenicidad de 24 aislamientos de hongos entomopatógenos Hypocreales sobre adultos de *H. betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae) en condiciones de laboratorio, siendo 15 aislamientos de *B. bassiana*, 2 aislamientos de *M. anisopliae* y 7 aislamientos de *P. lilacinum*. Los aislamientos de *B. bassiana* causaron porcentajes de mortalidad superiores al 53%, siendo los aislamientos CEP 334 y CEP 335 los más patogénicos, ya que causaron un 86,7% de mortalidad. Los aislamientos de *M. anisopliae* causaron porcentajes de mortalidad superiores al 70%, siendo el aislamiento CEP 350 el más patogénico, ya que causó un 83,3% de mortalidad. Sin embargo, no se observó patogenicidad por parte de los aislamientos de *P. lilacinum*.

También se evaluó la patogenicidad de 25 aislamientos de hongos entomopatógenos Hypocreales sobre adultos de *G. spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) en condiciones de laboratorio, siendo 17 aislamientos de *B. bassiana*, 2 aislamientos de *M. anisopliae* y 6 aislamientos de *P. lilacinum*. Se detectó muy poca patogenicidad por

parte de los aislamientos de *B. bassiana* y fue nula por parte de *M. anisopliae* y *P. lilacinum*.

Tomando como base los resultados obtenidos, se puede concluir que los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* obtenidos a partir de muestras de suelo de la provincia de Misiones tendrían condiciones potenciales para ser utilizados como agentes de control biológico de *H. betulinus* en cultivos de yerba mate de importancia económica en nuestro país.

**ABSTRACT**

Argentina is the world's largest producer of "Paraguay tea" *Ilex paraguariensis* (St. Hil.), 90% of national production is grown in the province of Misiones and the remaining 10% in the Corrientes region that borders it. The main pest species of rice in the province of Misiones are *Hedypathes betulinus* (Klug) (Coleoptera: Cerambycidae), popularly known as "drill or tiger of Paraguay tea" and *Gyropsylla spegazziniana* (Lieber) (Hemiptera: Psyllidae) "loop or psilide of Paraguay tea".

The control methods used for these insect pests of Paraguay tea are cultural control and chemical control. Cultural control for *H. betulinus* involves the manual collection of adults as well as pruning and weeding, leaving strips of secondary vegetation between the lines of Paraguay tea plants favoring visualization of insect and elimination of the warm regions of preference, exposing them to sunlight and action of predators. To control *G. spegazziniana* attacked sprouts pruning is performed, which are also necessary to maintain the strength, shape and quality of plants. Chemical control for both pest species involves the application of chemical insecticides, however, this type of management is not indicated, since there is the possibility of residue, which can carry toxic risk to consumers, because the Paraguay tea is practically consumed *in natura*. During the last decades the interest in integrated pest management (IPM) has increased, since its principal goal is to integrate different pest control strategies to reduce the use of synthetic insecticides. This kind of control involves the use of pathogens, parasites and predators to control insect pests, and this was one of the reasons supporting the survey and study of entomopathogenic microorganisms such as viruses, bacteria, protozoa and fungi to be used in insect pest control. Among the microorganisms used for biological control of insects, fungi are an important group of pathogens of insects and other arthropod pests. These fungi are considered to be excellent candidates as biological control agents, because they can infect insects directly through the cuticle, having easy dispersion, persistence in the ecosystem, tolerance to adverse factors for the development of spores of resistance, and manipulation *in vitro* is relatively easy. In Argentina there are several references to the presence and use of

fungal pathogens of insect pests, however, there are no studies on fungal pathogens of insect pests of Paraguay tea. Based on this background it was decided to raise the general objective of the study of diversity and pathogenicity of fungal pathogens of insect pests of Paraguay tea in the region of northeastern Argentina.

We conducted a survey of adults and juveniles of *H. betulinus* and *G. spegazziniana* in the period between May 2008 and September 2010 with a frequency of once every 15 days in different localities of the province of Misiones. As a result of these successive samples no apparent fungal infections in the field were observed, nor after the maintenance period of the insects in the laboratory. In different cultivated Paraguay tea organic and conventional in the province of Misiones, we collected 40 samples of soil, as a result of these successive samples and were isolated *in vitro* 29 of entomopathogenic fungi isolates, fungi are taxonomically placed in the Phylum Ascomycota, Class Sordariomycetes, Order Hypocreales, of which seventeen isolates were identified as *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill., two isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and ten of *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Hywel-Jones & Samson.

We evaluated the pathogenicity of 24 isolates of entomopathogenic fungi Hypocreales on adult *H. betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae) under laboratory conditions, with fifteen isolates of *B. bassiana*, two isolates of *M. anisopliae* and seven isolates of *P. lilacinum*. The isolates of *B. bassiana* caused mortality rates exceeding 53%, and isolates 334 and CEP 335 were the most pathogenic, and that caused 86.7% mortality. The isolates of *M. anisopliae* caused mortality above 70%, the isolation CEP 350 was the most pathogenic, and that caused 83.3% mortality. However, it was observed by pathogenic isolates of *P. lilacinum*.

We also evaluated the pathogenicity of 25 isolates of entomopathogenic fungi Hypocreales on adult *G. spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) under laboratory conditions, with seventeen isolates of *B. bassiana*, two isolates of *M. anisopliae* and six isolates of *P. lilacinum*. Little ability was detected by pathogenic isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* was nil of *P. lilacinum*.

Based on all results obtained, we conclude that the isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* obtained from soil samples from the province of Misiones have potential conditions to be used as biological control agents of *H. betulinus* and *G. spegazziniana* cultivation Paraguay tea of economic importance in our country.

## INTRODUCCIÓN

La “yerba mate” *Ilex paraguariensis* (Saint Hilaire, 1822), la especie más comunmente utilizada del género, pertenece a la familia Aquifoliaceae que presenta cerca de 600 especies, de las cuales 220 son nativas de América del Sur (Scherer, 1997; Sturion y Resende, 1997). El área de dispersión geográfica de esta especie está restringida a los siguientes países; Argentina, Brasil y Paraguay. En nuestro país, si bien la provincia de Misiones es la principal productora, existen en el nordeste de la provincia de Corrientes numerosos establecimientos que practican su cultivo (De Coll y Saini, 1992). Iede y Machado (1989) citaron 86 especies de insectos alimentándose de diferentes partes de la planta, por eso, pocas pueden ser consideradas plagas, ya que la mayoría ocurre esporádicamente en bajos niveles poblacionales, no causando daños económicos significativos. Solo seis especies de insectos son consideradas plagas del cultivo: *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae); *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles, 1919) (Hemiptera: Psyllidae); *Thelosia camina* (Schaus, 1920) (Lepidoptera: Eupterotidae); *Hylesia* (Hübner, 1820) (Lepidoptera: Saturniidae); *Ceroplastes grandis* (Hempel, 1900) (Hemiptera: Coccidae); e *Isomerida picticollis* (Bates, 1881) (Coleoptera: Cerambycidae) (Iede *et al.*, 2000).

*Hedypathes betulinus* conocido como “taladro o tigre de la yerba mate”, pertenece al orden Coleoptera, familia Cerambycidae. Es considerado el insecto que causa los daños más severos en los cultivos de yerba mate (Soares e Iede, 1997). Los adultos se alimentan de la corteza de las ramas más jóvenes y más viejas (Galileo *et al.*, 1993; Soares, 1998; Guedes *et al.*, 2000). Algunas hembras después de la postura se alimentan de las raíces finas que afloran de la superficie del suelo. Las larvas cuando recién eclosionan, perforan con sus mandíbulas la corteza de la planta hasta encontrar el leño que les sirve de alimento. Construyen galerías ascendentes o descendentes en espiral, dirigiéndose hacia las raíces de la planta donde provocan los mayores daños. Los daños dificultan la circulación de la savia, debilitando las plantas (Candido Filho, 1929; Alencar, 1960; Pedrosa-Macedo *et al.*, 1993; Penteado, 1995).

*Gyropsylla spegazziniana* conocida como “rulo o psilido de la yerba mate”, pertenece al orden Hemiptera, familia Psyllidae. Los psilidos son insectos pequeños, semejantes a cigarritas y de hábito succionador (Gallo *et al.*, 2002). *G. spegazziniana* es

específica del cultivo de yerba mate, siendo considerada una de las principales plagas. Los adultos y ninfas de *G. spegazziniana* succionan savia de las hojas nuevas e inyectan toxinas que causan hipertrofia en los tejidos, dando origen a estructuras, llamadas agallas, que resguardan a las ninfas. Las hojas deformadas se desarrollan mal y caen después de la salida de los insectos, reduciendo el rendimiento en la producción. Cuando el ataque ocurre en mudas recién plantadas, hay un retraso en su desarrollo (Chiaradia, 2000).

Los métodos de control más utilizados para los insectos plaga de la yerba mate son el control cultural y el control químico. Según Soares e Iede (1997), la colecta manual de los adultos de *H. betulinus* de la yerba mate es una de las prácticas actualmente recomendada para el control de esta plaga. El empleo de otras tácticas para la reducción de niveles poblacionales también deben ser empleados, como la poda y el desmalezamiento, dejando fajas de vegetación secundaria entre las líneas de las plantas de yerba mate. Estos métodos favorecen la visualización del insecto y eliminan las regiones de preferencia de resguardo, exponiéndolos a la insolación (desección) y acción de predadores. El control de *G. spegazziniana* puede realizarse a través de la poda de los brotes atacados, que también son necesaria para mantener el vigor, la forma y la calidad de las plantas. Se debe tener cuidado para evitar podas exageradas, ya que pueden perjudicar el metabolismo normal de las plantas (Da Croce, 2000; Díaz, 1997; Iede y Machado, 1989; Penteadó, 1995).

En un programa de MIP, todas las tácticas de supresión poblacional y métodos de control son importantes y pueden ser utilizados. Sin embargo, el uso de moléculas insecticidas en plantaciones forestales presenta serias restricciones. Para la yerba mate, el empleo de estos productos fueron prohibidos en Brasil no siendo así en Argentina, no hay principios activos comprobadamente eficaces y de baja toxicidad para este cultivo (Soares e Iede, 1997). Además de esto la aplicación y la eficiencia a campo deben ser adecuados al comportamiento y distribución del insecto en el área y en la planta (Leite *et. al.*, 2006a). Debido a esto, los métodos de control citados a seguir, con reducido impacto ambiental y de fácil armonización entre sí, son los recomendados para el MIP en yerba mate (Soares e Iede, 1997). Por lo tanto, a nivel mundial se ha comenzado a evaluar otros métodos de control tales como el control biológico, el cual consiste en el utilización de enemigos naturales de las plagas (parasitoides, depredadores y microorganismos patógenos) para mantener las poblaciones de las plagas en un nivel tal

que no genere un daño importante en las plantaciones (Van Lenteren y Woets, 1998; Berryman, 1999; Eilenberg *et al.*, 2001).

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos que tienen la particularidad de infectar a diferentes grupos de insectos y otros artrópodos, como las arañas y los ácaros (Boucias y Pendland, 1998). Estos hongos son considerados excelentes candidatos como agentes de control biológico, ya que pueden infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula, presentan dispersión activa o pasiva, persistencia en el medio, tolerancia a factores adversos debido al desarrollo de esporas de resistencia, y su manipulación en cultivos *in vitro* es relativamente fácil (Landa *et al.*, 1994; Murrin, 1996; Hajek, 2005).

Soares *et al.* (1995) y Soares e Iede (1997) detectaron la ocurrencia natural de los géneros *B. bassiana* y *M. anisopliae* en adultos de *H. betulinus*, en un yerbal del municipio de Ivaí, Paraná, Brasil. Para estos autores, cuando estos hongos son adecuadamente vehiculizados y aplicados, pueden presentar elevado potencial de control, bajo impacto ambiental y pocos residuos en el producto. Además de esto, pueden permanecer activos por largos períodos en el ambiente del cultivo. Estos organismos se encuentran naturalmente en los yerbales, indicando, también su adaptación al ecosistema modificado.

Sosa Gómez *et al.* (1994) relataron que en plantas de yerba mate, en Gobernador Virasoro, provincia de Corrientes, Argentina, se registraron niveles de infección de hasta 90% por el hongo *Zoophthora radicans* (Brefeld) sobre adultos de *G. spegazziniana*. En el Brasil, Alves *et al.* (2009) relataron esta misma asociación, en un yerbal en Cascavel, Paraná, Brasil, con niveles semejantes de ocurrencia de la población, siendo los únicos registros de entomopatógenos sobre *G. spegazziniana*.

En Brasil, numerosos estudios están siendo realizados para evaluar el efecto de los hongos entomopatógenos sobre “plagas de la yerba mate” en condiciones de laboratorio y a campo (Ribeiro, 1993; Dalla Santa, 2000; Oliveira *et al.*, 2000; Leite *et al.*, 2000; Leite *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2006b).

En la Argentina existen varias referencias sobre la presencia y el uso de hongos patógenos de insectos plaga (Marchionatto, 1934; Yasem de Romero, 1984; López Lastra, 1988, 1989, 1990; Lecuona, 1999; Toledo *et al.*, 2004, 2008; López Lastra y Scorsetti, 2006, 2007; Scorsetti, 2007a, 2007b, 2008). Sin embargo, no existen referencias de hongos patógenos de insectos plaga de la yerba mate en la Argentina.

Por lo tanto, en este proyecto de investigación se ha profundizado sobre el estudio de la interacción de los hongos patógenos y los insectos plaga de la yerba mate de la provincia de Misiones, Argentina. En primer lugar, se realizó una prospección y relevamiento de los hongos patógenos durante el período comprendido entre mayo de 2008 y septiembre de 2010. Luego, los hongos entoopatógenos aislados fueron identificados y caracterizados por métodos morfológicos y moleculares, y la patogenicidad de éstos se evaluó bajo condiciones de laboratorio.



# *Antecedentes*

## ANTECEDENTES

### 1.1. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

La “yerba mate” *Ilex paraguariensis* (Saint Hilaire, 1822), la especie más comunmente utilizada del género, pertenece a la familia Aquifoliaceae que presenta cerca de 600 especies, de las cuales 220 son nativas de América del Sur (Scherer, 1997; Sturion y Resende, 1997). El área de dispersión geográfica de esta especie está restringida a los siguientes países; Argentina, Brasil y Paraguay. En nuestro país, si bien la provincia de Misiones es la principal productora, existen en el nordeste de la provincia de Corrientes numerosos establecimientos que practican su cultivo (De Coll y Saini, 1992). La provincia de Misiones, República Argentina, corresponde a la región biogeográfica Paranaense de clima subtropical húmedo. Esta región presenta diferentes tipos de suelos, siendo los más característicos los derivados del basalto. Estos suelos son conocidos como "lateríticos" o "latosoles", y su coloración es rojiza o marrón-rojiza debido a la descomposición de los basaltos y meláfiros arcillosos; además son ácidos con un alto contenido de óxido de hierro, aluminio y nitrógeno.

La planta *I. paraguariensis* es una especie umbrófila, de clima templado subtropical, con lluvias regularmente distribuidas a lo largo del año (Carvalho, 1994). Crece en forma nativa o cultivada en suelos profundos, bien drenados, ligeramente ácidos, pero no tolera suelos muy compactos. La tierra colorada de Misiones, cargada de óxido de hierro, son las mejores, habida cuenta del desarrollo que la yerba mate adquiere sobre este tipo de suelo. La planta en un hábitat natural, puede medir entre 10 a 15 metros de altura y su densidad puede exceder centenas de individuos por hectárea (Carpanezi, 1995; Miranda y Urban, 1998). El tronco es de color gris, generalmente con 20 a 25 cm de diámetro. Las hojas son simples y alternas, se muestran estrechas en la base y ligeramente obtusas en el vértice. Las flores son de color blanco, pequeñas, dispuestas en las axilas de las hojas superiores. El fruto es globoso, de color verde pasando a rojo en su madurez (Mazuchowski, 1991; Valduga, 1995).

La yerba mate presenta un elevado índice de consumo doméstico y también genera ingresos por ventas en el exterior. Moviliza a los sectores productivo, industrial y comercial, siendo un cultivo estratégico desde el punto de vista de ocupación de mano

de obra. La importancia de la yerba mate, actualmente, se concentra en el área de bebidas para infusión, como té, mate, tereré y jugos (Carvalho, 1994).

Los datos estadísticos registrados por el Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) revelan que durante el mes de abril del año 2012 el volumen de yerba mate elaborada a salida de molino alcanzó los 12.674.148,13 kilos. Sumado a los meses anteriores totaliza 68.054.534, 11 kilos para el periodo enero – abril. Cabe recordar que el movimiento de yerba mate a salida de molino es el indicador más cercano al comportamiento de la yerba mate en góndola, ya que incluye tanto el volumen que se envía a los centros de distribución de las firmas yerbateras como a las compras efectuadas por los mayoristas, hipermercados y supermercados. El ingreso de materia prima a los establecimientos de secanza permite observar el avance de la cosecha en la región productora. Los datos indican que entre los meses de enero y abril fueron procesados 157.554.966, 89 kilos de hoja verde. Otros indicadores que permiten observar el movimiento de la actividad yerbatera son los stocks existentes de yerba mate canchada y de yerba mate molida. Para el primer caso se observan tres variantes: el stock de canchada en secaderos, en molinos y en poder de otros operadores. Los datos refieren que en abril de 2012 existía en secaderos un stock de 56.048.644, 95 kilos de canchada, mientras que los molinos contaban con un stock de 102.029.643, 05 kilos de canchada. El stock de canchada en poder de otros operadores era de 3.978.367, 08 kilos y, en cuanto a la yerba mate molida, al mes de abril la industria mantenía un stock de 13.487.314, 12 kilos (INYM, 2012).

## **1.2. Plagas de la Yerba Mate**

En un ambiente natural, la diversidad de las plantas sustenta la existencia de un complejo de enemigos naturales que mantienen diferentes especies de insectos en bajos niveles poblacionales. En cambio, en un ambiente artificial, como un monocultivo, hay una drástica eliminación de especies de plantas que sirven de alimento y abrigo a los enemigos naturales de insectos fitófagos. A este aspecto, se suma la mayor oferta de alimento, y de esta forma, especies de herbívoros que ocurrían en bajos niveles poblacionales se tornaron plagas, provocando severos daños al cultivo (Penteado, 1995).

Iede y Machado (1989) citaron 86 especies de insectos alimentándose de diferentes partes de la planta, por eso, pocas pueden ser consideradas plagas, ya que la

mayoría ocurre esporádicamente en bajos niveles poblacionales, no causando daños económicos significativos. Actualmente, solo seis especies son consideradas plagas del cultivo: *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae); *Gyropsylla spgazziniana* (Lizer y Trelles, 1919) (Hemiptera: Psyllidae); *Thelosia camina* (Schaus, 1920) (Lepidoptera: Eupterotidae); *Hylesia* (Hübner, 1820) (Lepidoptera: Saturniidae); *Ceroplastes grandis* (Hempel, 1900) (Hemiptera: Coccidae); e *Isomerida picticollis* (Bates, 1881) (Coleoptera: Cerambycidae) Iede *et al.* (2000).

### 1.3. *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825)

#### 1.3.1. Biología de *H. betulinus*

*Hedypathes betulinus* conocido como “taladro o tigre de la yerba mate”, pertenece al orden Coleoptera, familia Cerambycidae. Es considerado el insecto que causa los daños más severos en los cultivos de yerba mate (Soares e Iede, 1997).

Los adultos miden 25 mm de largo (Candido Filho, 1929; Brandão Filho, 1945; Alencar, 1960; Pedrosa-Macedo, 1993), cuerpo cubierto de pelos, con mayor densidad en la cabeza, pronoto y élitros, en estos últimos, aparecen manchas negras transversales en forma de “M” (Cassanello, 1993). Las antenas son largas, finas y poseen 11 artejos, con manchas blancas y oscuras alternadas (Pedrosa-Macedo, 1993). Se puede observar dimorfismo sexual por medio de los escapos y fémures de los machos que son mayores de que de las hembras (Cassanello, 1993), (Figura 1 A).

De acuerdo con Soares (1998) y d’ Avila (2002) la cópula puede ocurrir por toda la copa de las plantas de yerba mate, sobre los troncos y gajos gruesos, no siendo detectada la preferencia por una determinada región de la planta. El mayor número de cópulas ocurre entre los meses de febrero a marzo (Soares, 1998). La postura puede ser realizada en el tronco o en los gajos gruesos de los árboles, pudiendo ocurrir en la cáscara, siendo colocado un huevo por gajo (Candido Filho, 1929; Brandão Filho 1945; Alencar, 1960). Los adultos se alimentan de la cáscara de las ramas más jóvenes y más viejas (Galileo *et al.*, 1993; Soares, 1998; Guedes *et al.*, 2000). Algunas hembras después de la postura se alimentan de las raíces finas que afloran de la superficie del suelo. Los mayores daños, por causa de la alimentación, ocurren en gajos de diámetro entre 30 y 40 mm con mayor intensidad en el período entre las 10 y 18 horas, siendo las

hembras más voraces que los machos (Guedes *et al.*, 2000). La duración de la fase de adulto es de 42 semanas (294 días) para los machos y de 19 semanas (133 días) para las hembras (Soares, 1998). Cassanello (1993) encontró resultado diferente para la longevidad de los machos de 100,60 a 146,89 días. Esa variación puede ser, probablemente, en razón de las condiciones de temperatura y humedad que, en la investigación de Cassanello (1993), fueron controladas en laboratorio favoreciendo el desarrollo del insecto. El adulto de taladro de la yerba mate es de movimiento lento y casi no realiza vuelos (Galileo *et al.*, 1993; Soares, 1998; d'Avila, 2002).

El huevo presenta forma elíptica, transparente y aparentemente liso, coloración blanco amarillenta, con 2,2 a 2,7 mm de largo y 1,2 a 1,4 mm de ancho, el período de incubación de los huevos es de 12,05 días ( $\pm 7$  y 17) (Cassanello, 1993; Galileo *et al.*, 1993).

Las larvas son apodas y blancas, cuando recién eclosionan, perforan con sus mandíbulas la cáscara de la planta hasta encontrar el leño que les sirve de alimento. Construyen galerías ascendentes o descendentes en espiral, dirigiéndose hacia las raíces de la planta donde provocan los mayores daños (Figura 1 B y C). Los daños dificultan la circulación de la savia, debilitando las plantas (Candido Filho, 1929; Alencar, 1960; Pedrosa-Macedo *et al.*, 1993; Penteado, 1995). Cuando se aproxima el período de pupa, la larva desciende a través de la galería, dejando a la planta susceptible al quiebre por la acción de los vientos, el que puede causar mortalidad de los árboles (Alencar, 1960). Según Cassanello (1993) el número de estadios varía de ocho a diez, con una duración media variable de 8,93 días en el primer estadio a 50,50 días en el décimo estadio. El desarrollo de la larva dura, aproximadamente 278,36 días ( $\pm 213$  y 420). En esta fase una gran cantidad de aserrín es producida, una parte de esta queda acumulada y compactada atrás de la larva, probablemente, proporcionando protección, y otra parte es siempre lanzada para afuera, a través de pequeños orificios hechos en el gajo, por la propia larva (Cassanello, 1993; Pedrosa-Macedo *et al.*, 1993).

Los síntomas de ataque son la presencia de aserrín próxima a la base de las plantas, árboles con follaje escaso y amarillo. En plantas donde el ataque es intenso, se encuentra gran número de gajos quebrados, debido a las galerías y por la acción del viento. Los gajos se quiebran justamente a la altura de las galerías, practicadas por las larvas que generalmente permanecen en el gajo quebrado (Candido-Filho, 1929; Brandão-Filho, 1945; Alencar, 1960; Cassanello, 1993). El período de pre-pupa se inicia en el momento en que la larva, después de construir la cámara pupal, queda en

posición de reposo con el cuerpo retraído y curvado. Las cámaras de las pupas varían de 16,0 a 17,4 mm de ancho y 28,4 a 29,2 mm de largo, dicha cámara es construida en posición longitudinal dentro del gajo, con el extremo superior más próximo a la cáscara, probablemente, para facilitar la salida del adulto. Ambas extremidades de la cámara son protegidas con aserrín, construida por fibras de tejido vegetal que tienen 30 mm de largo. La pupa mide de largo 32 mm y 18 mm de ancho, el período de permanencia en la cámara de la pupa comprende desde la emergencia del adulto hasta su salida de la cámara. El ciclo de vida es de aproximadamente 489,75 días ( $\pm$  372 y 608) para las hembras y de 422,60 días ( $\pm$  401 y 474) para los machos (Cassanello, 1993).



**Figura 1.** *Hedypathes betulinus*. A. Adulto. B. Larva. C. Galería realizada en el tronco de *I. paraguariensis* (yerba mate)

### 1.3.2. Fluctuación poblacional de *H. betulinus*

Los datos referentes a la fluctuación poblacional, citados por Soares (1998) e Iede *et al.* (2000), indican que los adultos están presentes durante todo el año en los yerbales, la mayor incidencia es entre los meses de octubre y finales de junio, con pico poblacional entre febrero y marzo. Los machos están presentes en el yerbal aproximadamente un mes antes que las hembras, y son más abundantes en el período comprendido entre agosto y marzo. Sin embargo, los menores niveles poblacionales registrados en estos estudios, las hembras eran más numerosas. Según Soares (1998), las variaciones numéricas de las poblaciones son influenciadas por la temperatura, y no por la precipitación. Por lo tanto, las mayores poblaciones fueron verificadas cuando la

temperatura fue igual o superior a 20 °C, constatándose que la fluctuación poblacional es de tipo estacional, con mayor actividad en las estaciones más calientes.

#### **1.4. *Gyropsylla spegazziniana* (Lieber, 1919)**

##### **1.4.1. Biología de *G. spegazziniana***

*Gyropsylla spegazziniana* conocida como “rulo o psilido de la yerba mate”, pertenece al orden Hemiptera, familia Psyllidae. Los psilidos son insectos pequeños, semejantes a cigarritas y de hábito succionador (Gallo *et al.*, 2002). *Gyropsylla spegazziniana* es específica del cultivo de yerba mate, siendo considerada una de las principales plagas. Las pérdidas en la producción causadas por el rulo en la Argentina pueden llegar a 35% (Diaz, 1997) y 54% en el Brasil (EMBRAPA, 2004).

Los psilidos son insectos saltadores, con un largo que varía de 0,1 mm a 10 mm, en el caso de *G. spegazziniana* los machos miden 2,2 mm y las hembras 2,6 mm con coloración verde amarillenta (Figura 2 A). Los ojos son compuestos, grandes y ovalados de coloración gris. Las antenas, de color pardo oscuro, poseen 10 artejos, son filiformes y tan largas como el cuerpo del insecto. La superficie del tórax es glabra, las suturas y espiráculos están cubiertas de cera. Presenta dos pares de alas membranosas hialinas, las patas de color verdoso, que le permiten caminar (los dos primeros pares) y saltar (el tercer par). Las tibias posteriores poseen una corona de espinas que le sirven de protección contra los fuertes golpes durante el salto.

El psilido está en forma agregada o aleatoria y el mayor daño ocurre en épocas de primavera hasta el final del verano y comienzo del otoño. La duración del ciclo de vida y la determinación de las formas estratégicas son en gran parte definidas por los factores climáticos, principalmente en las regiones templadas. En las regiones tropicales, muchas especies poseen superposición de varias generaciones a lo largo del año (Burchkardt, 1994) y presentan cinco estadios ninfales (White y Hodkinson, 1985). El psilido tiene de 8 a 9 generaciones por año. El ciclo completo es de alrededor de 30 días, se encuentra en el campo durante todo el año soportando variaciones anuales de temperatura entre -0,5 °C y 42 °C. La temperatura para la actividad del adulto es de 20° a 25° C (De Coll y Saini, 1992). Oglobin (1929) y Flores (1983) estudiaron el comportamiento del psilido y observaron que las hembras buscan los brotes de la yerba

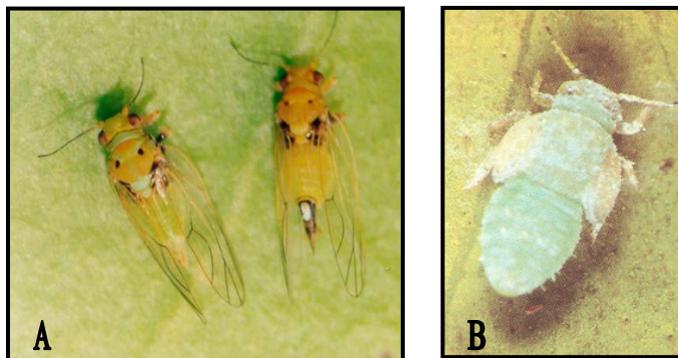
mate, donde comienzan a abrirlas, para colocar sus huevos. Las formas más jóvenes atacan los brotes causando deformaciones. En las hojas pequeñas de 3 a 5 mm de ancho la hembra introduce el ovipositor y coloca los huevos en la parte superior de los brotes a lo largo de la nervadura central, antes de efectuar la postura inyecta una sustancia tóxica. Después de la eclosión las ninfas comienzan a alimentarse inyectando su probóscide, en los tejidos de los brotes, provocando una mayor reacción de estos, que consecuentemente no se desarrollarán.

De Coll y Saini (1992) citan que la hembra del psilido realiza la postura en los brotes inyectando la toxina en la nervadura central de las hojas. Los huevos se encuentran muy próximos a la nervadura central, miden aproximadamente 0,42 mm de ancho y 0,15 mm de diámetro, son elípticos, pedunculados y de coloración blanco amarillento y en la madurez amarillo anaranjado. Eclosionan a los 6 u 8 días. La oviposición alcanza hasta 32 huevos por postura, disponiéndolos en forma de rosetón, siendo que varias hembras pueden ovipositar en la misma hoja antes de que se forme el rulo. El máximo de huevos encontrados por hoja fue de 120 huevos. El número de individuos por hoja enrollada, puede alcanzar de 100 a 150, y viven protegidos en la agalla durante 20 a 25 días.

Las ninfas son chatas dorso centralmente, lo que favorece la pérdida de agua, tornándose sensibles a las condiciones ambientales (Figura 2 B). De esta forma, algunas especies inducen la formación del “rulo”, otras excretan ceras y “honeydew” rocío de miel, que sirven como forma de protección (Burchkardt, 1994). Las ceras son producidas por glándulas en la base de las setas presentes en el ápice de abdomen (Caver *et al.*, 1991).

Los adultos y ninfas de *G. spegazziniana* succionan savia de las hojas nuevas e inyectan toxinas que causan hipertrofia en los tejidos, dando origen a estructuras, llamadas agallas, que resguardan a las ninfas. Las hojas deformadas se desarrollan mal y caen después de la salida de los insectos, reduciendo el rendimiento en la producción. Cuando el ataque ocurre en mudas recién plantadas, hay un retraso en su desarrollo (Chiaradia, 2000). En cuanto a los efectos de las agallas sobre las plantas (Mani, 1964) cita que ocurren desvíos en el crecimiento, desordenes en la savia, decadencia prematura en las hojas y otras injurias. Para Fernandes y Martins (1985) el desarrollo de la agalla compromete las células del hospedero, provocando desvío de sustancias, bloqueo de vasos conductores y atrofia de los órganos. De esta manera, se puede afirmar

que la acción de la agalla compromete la vitalidad de la planta hospedera, por interferir en su metabolismo.



**Figura 2.** *Gyropsylla spegazziniana*. **A.** Adultos. **B.** Ninfa.

#### **1.4.2. Fluctuación poblacional de *G. spegazziniana***

Algunas informaciones sobre el comportamiento de *G. spegazziniana* son contradictorias. Según Gallo *et al.* (1988) la mayor incidencia de esta plaga es en los meses de septiembre a diciembre. Según Borges (2002) el pico poblacional para adultos de *G. spegazziniana* es de noviembre a febrero. Mattos (1982) comenta que la mayor infestación de este insecto ocurre en el período de noviembre a febrero, lo que concuerda con Borges (2002). Según Flores (1983) en la Argentina los períodos de mayor ataque de estos psilidos ocurren de marzo a mayo y de agosto a octubre. Durante el invierno los insectos se refugian en la corteza de la planta o en las hojas secas aguardando la primavera cuando la planta entra en brotación, para iniciar el ataque que es generalmente más intenso en noviembre (Mattos, 1982). La distribución de los adultos de *G. spegazziniana* está asociada a las condiciones de brotación de los árboles, condición necesaria para la postura. De Coll y Saini (1992) citan que en los yerbales con poda el ataque del insecto se manifiesta con mayor intensidad y que la incidencia del insecto en algunas áreas es de 100%.

### 1.5. Manejo Integrado de Plagas en Yerba Mate

El uso indiscriminado y continuo de productos fitosanitarios en cultivos de importancia económica ha sido el principal factor de desequilibrio ecológico, contribuyendo el aumento de las poblaciones de plagas, reducción de la productividad y efectos indeseables sobre el ambiente, el hombre y otros animales. Además de eso, casos de resistencia a estos defensivos agrícolas detectados en diversas especies de plagas, como su costo elevado, han estimulado el desarrollo de Programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) como la mejor alternativa en la preservación del equilibrio en los ecosistemas (Lacey *et al.*, 2001; Gallo *et al.*, 2002).

La combinación de técnicas y recursos disponibles utilizados en el MIP consiste en la utilización de métodos biológicos, culturales y químicos que puedan estabilizar la población de plagas en el cultivo, no dejando que estas lleguen a un nivel de daño económico. Aumentando la productividad y la calidad de la yerba mate, reduciendo los daños causados al medio ambiente y al hombre (Crocomo 1990; Diaz 1997; Pereira *et al.*, 1998). Los principales métodos y medidas para el control de las plagas son: a) legislativas, b) físicos, c) mecánicos, d) de resistencia de plantas a los insectos y enfermedades, e) por comportamiento, f) químico, g) biológico entre otros (Fiorentino y Diodato, 1997). Para el manejo integrado de plagas (MIP) es primordial un monitoreo adecuado estudiando la detección de las alteraciones en la densidad y dinámica poblacional del insecto. Estas evaluaciones son estrategias necesarias para la predicción de un aumento de las plagas y la rápida toma de decisiones para su control (Soares e Iede, 1997; Leite *et al.*, 2006a). En un programa de MIP, todas las tácticas de supresión poblacional y métodos de control son importantes y pueden ser utilizados. Sin embargo, el uso de insecticidas en plantaciones forestales presenta serias restricciones. Para la yerba mate, el empleo de estos productos fueron prohibidos en Brasil no siendo así en Argentina, no hay principios activos comprobadamente eficaces y de baja toxicidad para este cultivo (Soares e Iede, 1997). Además de esto la aplicación y la eficiencia a campo deben ser adecuados al comportamiento y distribución del insecto en el área y en la planta (Leite *et al.*, 2006a). Debido a esto, los métodos de control citados a seguir, con reducido impacto ambiental y de fácil armonización entre sí, son los recomendados para el MIP en yerba mate (Soares e Iede, 1997).

En el control biológico pueden ser utilizados agentes que regulen las densidades poblacionales de los insectos o plantas consideradas plagas de los cultivos comerciales.

Entre los agentes más utilizados están los enemigos naturales (parasitoides y depredadores) y los patógenos (hongos, virus, bacterias, nemátodos y protozoarios) (Gallo *et al.*, 2002; Alves, 1998). Entre los patógenos, los hongos entomopatógenos son el principal grupo, y su ocurrencia natural es el factor determinante en la regulación poblacional de insectos plaga (Sousa, 1999).

### **1.5.1. Control cultural**

Según Dent (1991) el manejo cultural utiliza la manipulación del ambiente agrícola de tal forma que se torne inadecuado para el insecto plaga, disminuyendo las posibilidades de colonización por el insecto y promoviendo su dispersión, reduciendo su reproducción y supervivencia. El manejo agroecológico utiliza la diversificación vegetal, de modo de favorecer a las especies benéficas y desfavorecer a las plagas (Altieri, 1989).

Según Soares e Iede (1997) la colecta manual de los adultos de *H. betulinus* es una de las prácticas actualmente recomendada para el control de esta plaga. A pesar de que este método parezca primitivo, en áreas donde este es empleado, los daños provocados por el taladro son considerados soportables. Este método es adoptado por la mayoría de las empresas yerbateras con elevados niveles de tecnificación, indicando ser adecuado y compatible con la producción moderna. El empleo de otras tácticas para la reducción de niveles poblacionales también deben ser empleados, como la poda y el desmalezamiento, dejando fajas de vegetación secundaria entre las líneas de las plantas de yerba mate. Estos métodos favorecen la visualización del insecto y eliminan las regiones de preferencia de abrigo, exponiéndolos a la insolación (desección) y acción de predadores. Estas prácticas también mejoran las condiciones microclimáticas y la eficiencia del control biológico con hongos entomopatógenos (Soares e Iede, 1997; Leite *et al.* 2006a).

El control de *G. spegazziniana* puede realizarse a través de la poda de los brotes atacados, que también es necesaria para mantener el vigor, la forma y la calidad de las plantas. Se debe tener cuidado para evitar podas exageradas, ya que pueden perjudicar el metabolismo normal de las plantas (Da Croce, 2000; Díaz, 1997; Iede y Machado, 1989; Penteado, 1995). Ribeiro (2005) recomienda que la yerba mate no debe ser cosechada en verano, debido a la presencia de las agallas y consecuentemente del residuo del mismo en la materia prima, lo que aumenta los compuestos nitrogenados,

por la composición del insecto (quitina). La sequía es un factor importante en la regulación poblacional de *G. spegazziniana* (De Coll y Saini, 1992).

### 1.5.2. Control químico

En la Argentina no existe ninguna legislación que prohíba el uso de insecticidas, según el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria - SENASA los productos registrados para el cultivo de yerba mate son: Dimetoato (Acaricida-Insecticida), Glifosato (Herbicida), Oxifluorfen (Herbicida) y Paraquat (Herbicida) (SENASA, 2011). Sin embargo, la legislación brasilera prohíbe la aplicación de insecticidas en el cultivo de la yerba mate, por ser un producto consumido principalmente *in natura*.

La utilización del control químico no es indicada, especialmente por no existir productos evaluados y registrados para *H. betulinus*, la utilización de los mismos podrían acarrear riesgos de intoxicación a los consumidores (Penteado *et al.*, 2000).

Actualmente no se dispone de un sistema eficiente de monitoreo para *G. spegazziniana* que permita preveer el momento adecuado para la adopción de medidas de control (Penteado *et al.*, 2000). Algunos tipos de control químico de *G. spegazziniana* fueron testeados y se obtuvieron buenos resultados en el control de los adultos, sin embargo, se llegó a la conclusión que el control no era efectivo debido a la protección de las ninfas en las agallas (Flores, 1983). En Argentina por muchos años, se usaron plaguicidas en forma indiscriminada para el control de *G. spegazziniana*. Luego, con la caída de precio de la hoja verde, se disminuyó el uso de químicos, y existen muchos yerbales que ya no reciben tratamiento alguno contra esta plaga. Para evitar daños económicos, conviene realizar aplicaciones en primavera, verano u otoño, recién cuando se encuentran más de 120 individuos cada 20 golpes a brotes, en caza libre. Los principios activos son Dimetoato, Metildemetón y Endosulfán, diluidos en agua a razón de 100-150 mL cada 100 L (Burtnik, 2003). Leite (2000) afirma que en el caso de los psilidos de la yerba mate, es común que se realicen varias aplicaciones de insecticidas, debido al elevado número de generaciones anuales. Se deben escoger también productos de baja toxicidad, de corto poder residual y de preferencia selectivos a los enemigos naturales a fin de evitar desequilibrios al medio ambiente (Iede y Machado, 1989).

### 1.5.3. Control físico

En la yerba mate, para el control físico se han utilizado trampas luminosas y/o coloridas. Prat Kricun (1986) utilizó trampas amarillas tipo Möerick. Sin embargo, Chiaradia y Milanez (1997) estudiaron la actividad del rulo de la yerba mate con trampas de diferentes colores y concluyeron que las trampas de color rojo eran más eficientes, las cuales fueron instaladas sobre filas de árboles, en soportes de madera de 1,40 m de altura conteniendo agua y detergente.

Chiaradia *et al.* (2000) afirman que adultos del rulo de la yerba mate son también atraídos por trampas luminosas, equipadas con lámparas ultravioleta modelo F-15, T-12. Leite *et al.* (2007) desarrollaron trampa colorida Gyrotrap 95<sup>®</sup>, utilizada posteriormente por Borges y Lazzari (2008) para estudios de los psilidos en el cultivo.

### 1.5.4. Control biológico

En Brasil se han identificado muchos enemigos naturales asociados a *H. betulinus*, en el grupo de los microhimenópteros se encuentran los parasitoides de huevos *Eurytoma* sp. (Hymenoptera: Eurytomidae) (Penteado, 1995; Soares, 1995) y de larvas *Labena* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Ribeiro, 1993; Pagliosa *et al.*, 1994; Soares, 1998; Graf y Marzagão, 1999). Entre los depredadores se encuentran las hormigas depredadoras de huevos *Pheidole* sp. y *Solenopsis* sp. (Hymenoptera: Formicidae) y las chinches depredadoras de adultos *Alcaeorrhynchus grandis*, *Brontocerus tabidus*, *Tynacantha marginata* (Hemiptera: Pentatomidae), *Arilus carinatus* y *Apiomerus* sp. (Hemiptera: Reduviidae) (De Coll y Saini, 1993; Diaz, 1997; Soares e Iede, 1997; Soares, 1998; Penteado *et al.*, 2000). Entre otros depredadores de insectos adultos se encuentran los pájaros *Guira guira* (Cuculiformes: Cuculidae), *Zonotricha capensis* (Tico - tico) (Passeriformes: Fringillidae) (Soares, 1998). *Numida melegaris* (Galliformes: Numididae) (Anuário brasileiro da erva mate, 1999).

El control por enemigos naturales de *G. spegazziniana* como técnica de manejo tienen como organismos en Argentina y Brasil: los depredadores Sífidos (Diptera: Syrphidae) (*Ocyrtamus* sp. *Pseudodorus clavatus*, *Toxomerus* sp., *Allograpta* sp., *Syrphus fasciifrons* y *Syrphus caldos*); los crisópidos (Neuroptera: Chrysopidae) (*Chrysopodes oglobini* y *Chrysoperla externa*); los coccinélidos (Coleoptera: Curculionidae) (*Heilus* sp., *Curinus coeruleus*, *Cycloneda sanguinea*, *Scymus*

*argentinicus*, *Scymus* sp., *Azya luteipes*, *Hyperaspis munhi* y *Olla* sp.) y las chinches *Podisus connexivius* (Hemiptera: Pentatomidae) y *Largus rufipennis* (Hemiptera: Largidae) (Diaz, 1997; Penteadó *et al.*, 2000).

### **1.6. Hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano de plagas de la yerba mate**

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos que tienen la particularidad de parasitar a diferentes grupos de insectos y otros artrópodos, como las arañas y los ácaros (Boucias y Pendland, 1998). Dentro del grupo de los insectos, los hongos entomopatógenos infectan mayoritariamente los órdenes Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera, donde la infección ocurre frecuentemente en los estados inmaduros (larvas o ninfas) y en los adultos (Tanada y Kaya, 1993).

Los hongos entomopatógenos han sido ampliamente estudiados en todo el mundo, habiendo sido citadas más de 750 especies reunidas en 100 géneros diferentes (Lecuona, 1996; Vega y Blackwell, 2005). Los principales grupos de hongos patógenos de insectos se encuentran en Reino Mycota y se ubican en los Phyla Ascomycota y Entomophthoromycota (Murrin, 1996; Hajek y Dellalibera, 2010; Humber 2012).

Los hongos del Phylum Ascomycota, se caracterizan por presentar hifas septadas que se diferencian en conidióforos, células conidiógenas o fiálides y conidios los cuales corresponden a las estructuras reproductivas asexuales. La producción de los conidios ocurre en las células conidiógenas erectas del micelio aéreo y la dispersión de éstos es de manera pasiva. Estos hongos, se encuentran en la naturaleza mayoritariamente en su estado asexual o conidial (anamorfo) más que en su estado sexual (teleomorfo). Por eso, antiguamente eran clasificados como “Imperfectos” y se incluían dentro del subphylum “Deuteromycota”. Actualmente, los hongos entomopatógenos más importantes del Phylum Ascomycota, se ubican en Subphylum Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales subdividido en tres familias. En la Familia Clavicipitaceae se han citado como patógenos los géneros *Aschersonia*, *Hypocrella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*; en la Familia Cordycipitaceae se hallan *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, y en la Familia Ophiocordycipitaceae, se encuentran los géneros *Ophiocordyces*, *Hirsutella*,

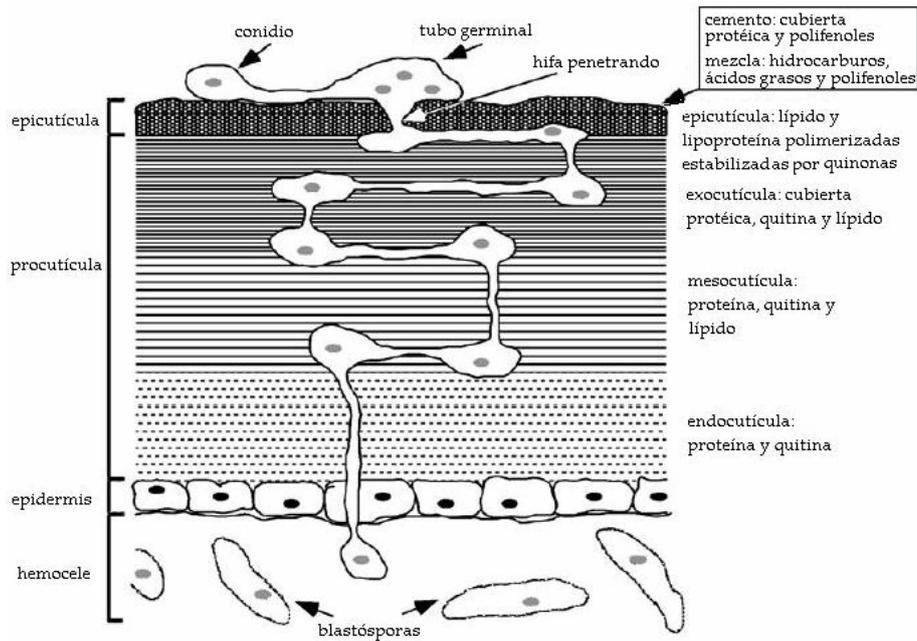
*Tolypocladium*, *Hasposporium* y *Purpureocillium* (Samson *et al.*, 1988; Humber, 1997; Hodge, 2003; Sung *et al.*, 2007; Sosa-Gómez *et al.*, 2010).

Dentro del Phylum Entomophthoromycotina, Orden Entomophthorales, se incluyen más de 200 especies patógenas, las cuales generan epizootias en hemípteros, lepidópteros, ortópteros y dípteros. Los hongos de este orden se caracterizan por presentar hifas no septadas y son de reproducción asexual y sexual. La reproducción sexual ocurre por la formación de conidios primarios, los cuales germinan y penetran en el insecto, pudiendo originar conidios secundarios y terciarios. Dentro del insecto producen cuerpos hifales y, si las condiciones no son favorables, forman esporas de resistencia. Además, tienen la característica de emitir rizoides que fijan el insecto al sustrato vegetal. Las principales especies de Entomophthorales son: *Conidiobolus*, *Zoophthora*, *Pandora*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Neozygites* (Papierok y Hajek, 1997; Humber, 1997; Benny *et al.*, 2001; Hibbett *et al.*, 2007; Sosa-Gómez *et al.*, 2010).

En general los hongos del Phylum Ascomycota son considerados como patógenos facultativos, infectando un amplio rango de órdenes de insectos. La muerte del hospedador está asociada comúnmente a la producción de toxinas, a diferencia de los hongos del Subphylum Entomophthoromycotina, en los que la muerte del insecto hospedador ocurre debido a la colonización de tejidos (Humber, 1984). Aún cuando las condiciones ambientales sean las apropiadas, la patogenicidad del hongo dependerá del insecto hospedador. La defensa de los insectos contra las infecciones fúngicas puede estar dada a nivel cuticular, inmunológico o de comportamiento, el rango de especificidad puede variar desde una especie hasta una amplia diversidad de especies hospedadoras (Boucias y Pendland, 1998).

### **1.7. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos**

El ciclo de infección de los hongos entomopatógenos y el consecuente desarrollo de una micosis, ocurre en una serie de pasos que se detallan a continuación y se representan en la Figura 3.



**Figura 3. Estructura y composición de la cutícula del insecto y esquema de la penetración (modificado de Duperchy, 2003).**

### 1.7.1. Adhesión de los propágulos infectivos a la cutícula del insecto

El paso inicial en la infección de los insectos por los hongos patógenos involucra la adhesión de los propágulos infectivos (conidios o esporas) a la cutícula del insecto, lo cual ocurre por las propiedades físicas, químicas y electrostáticas de la superficie del conidio y de la cutícula. Según Duperchy (2003), la adhesión del conidio a la cutícula del huésped, no es específica en muchos casos. Algunas especies de hongos presentan glicoproteínas (como las lectinas), mucopolisacáridos o enzimas (esterasas y lipasas) que favorecen la adhesión de las esporas a sitios específicos de la cutícula (Tanada y Kaya, 1993; Lecuona, 1996; Boucias y Pendland, 1998).

### 1.7.2. Germinación de los propágulos infectivos

Luego de la adhesión e hidratación de los conidios, ocurre la germinación de los conidios que origina un tubo germinativo y, en algunos casos, la formación de un apresorio. La formación del apresorio está relacionada con la capacidad de penetrar la

cutícula de los insectos, debido a la presión mecánica o a una actividad enzimática en el ápice del mismo (Murrin, 1996). La presencia del apresorio se demostró *in vitro* e *in vivo* en diferentes hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, *I. farinosa* y *M. anisopliae* (Lecuona, 1996). El resultado de la germinación y la penetración no depende necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, el modo de germinación, la agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedador (Samson *et al.*, 1988; Shapiro *et al.*, 2008).

### **1.7.3. Penetración del tegumento**

El modo de penetración principalmente depende de las propiedades de la cutícula, el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales del tegumento del insecto (Charnley, 1984). En la penetración participan dos mecanismos: uno físico y otro enzimático. El primero consiste en la presión mecánica ejercida por el extremo de la hifa invasiva o por el apresorio, que origina el quiebre de las áreas esclerotizadas y membranosas y la consecuente deformación de la cutícula (Tanada y Kaya, 1993). El mecanismo enzimático consiste en la acción de proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan la cutícula en la zona de penetración y facilita la penetración del tubo germinativo o hifa invasiva. Estudios *in vitro* demostraron que la digestión del tegumento del insecto es llevada a cabo por esterases y proteasas en las primeras 24 horas de la infección, seguido de la actividad de quitinasas y quitobiasas en el tercer día, y finalmente, la acción de las lipasas a partir del quinto día (Tanada y Kaya, 1993; St. Leger, 1986). Sin embargo, la secreción de enzimas durante los primeros estadios de desarrollo del hongo no es siempre condición suficiente para asegurar la penetración del tegumento (Lecuona, 1996).

### **1.7.4. Multiplicación del hongo en el hemocele y muerte del insecto**

Una vez en el interior del insecto, la mayoría de los hongos entomopatógenos convierten el crecimiento del micelio en un crecimiento por gemación, dando formas miceliales unicelulares llamadas blastosporas (en Ascomycota), cuerpos hifales (en Entomophthorales) o protoplastos, que se multiplican y se dispersan rápidamente por el interior del insecto (Samson *et al.*, 1988; Murrin, 1996; Boucias y Pendland, 1998). Estas estructuras fúngicas evitan la defensa inmune del insecto ya que no son

reconocidas por la población de hemocitos del insecto (Tanada y Kaya, 1993). Previo a la muerte del insecto, la multiplicación del hongo en el interior del insecto origina cambios fisiológicos que se observan como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados (Lecuona, 1996). La muerte del insecto puede ocasionarse por la secreción de sustancias tóxicas denominadas micotoxinas (en Ascomycotas) o por la depleción de los nutrientes de la hemolinfa y la invasión completa de los tejidos del insecto (en Entomophthorales) (Tanada y Kaya, 1993; Murrin, 1996; Boucias y Pendland, 1998). El tiempo que demanda la muerte del insecto dependerá del hongo entomopatógeno, del insecto hospedador y de los factores ambientales (Lecuona, 1996).

#### **1.7.5. Emersión del hongo y dispersión de los propágulos infectivos**

Después de la muerte del insecto, si las condiciones ambientales no son favorables, el hongo permanece en el interior del insecto y el tegumento se mantiene intacto. Sin embargo, si las condiciones de humedad relativa son altas, las estructuras fúngicas logran atravesar nuevamente el tegumento para emerger hacia el exterior del insecto. Generalmente, la emersión del hongo ocurre por regiones menos esclerosadas de la cutícula, como las membranas intersegmentales o los espiráculos (Lecuona, 1996). Si las condiciones de humedad relativa son altas, las hifas presentes en el exterior del insecto producen esporas dentro de las 24 a 48 horas. El insecto pasa ahora a tomar una coloración característica para cada especie de hongo, como por ejemplo, blanca en *Beauveria*, verde malaquita en *Nomuraea*, blanca amarillenta o rosa en *Isaria*. Los propágulos infectivos (esporas o conidios) producidos en el exterior del cadáver son dispersados por el viento, agua o animales, y cuando éstos tiene contacto con otro insecto comienza nuevamente el ciclo de infección (Boucias y Pendland, 1998). La dispersión de las esporas o conidios depende de las características de la espora y del esporangio, siendo un proceso activo en los hongos Entomophthorales o pasivo en los hongos Ascomycota (Tanada y Kaya, 1993; Shah y Pell, 2003).

#### **1.8. Mecanismo de defensa de los insectos**

En general, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ha sido el organismo modelo utilizado para dilucidar los mecanismos de defensa de los insectos ante el

ataque de los patógenos, los cuales han sido clasificados en 1) barreras físico-químicas y 2) sistema inmune innato (Meister *et al.*, 1997; Elrod-Erickson *et al.*, 2000; Levitin y Whiteway, 2008) y 3) otras estrategias de defensa. En el caso de insectos sociales, como abejas, termitas y hormigas también se ha observado que adaptaciones de su comportamiento permiten mantener la inmunidad de sus colonias (Richard *et al.*, 2008).

### **1.8.1. Barreras físico-químicas**

La cutícula es la primera línea de defensa al ser una estructura rígida que recubre la parte externa del insecto conformada por dos capas: la epicutícula y la procutícula. La primera está compuesta principalmente por grasas, ceras y lipoproteínas, cuya función es evitar la pérdida de agua por la transpiración. La segunda es la más abundante ya que constituye el 95% de esta estructura y está compuesta de quitina y diversas proteínas estructurales que proporcionan rigidez, actuando como una barrera física a la penetración de los patógenos, además de ser difícilmente degradada por las enzimas líticas excretadas por los mismos (Hajek y St. Leger, 1994). En la actualidad se considera que la cutícula tiene una función más activa, ya que desde la epidermis se secretan moléculas que actúan de manera específica inhibiendo los mecanismos de infección de los entomopatógenos. Se ha reportado que en la cutícula se da la producción de proteasas, peptidasas antifúngicas e inhibidores de proteasas fúngicas que podrían tener un papel importante durante la infección, además de la presencia de ácidos grasos de cadena corta y lípidos de cutícula que inhiben la germinación de las esporas de los hongos (Dunn, 1991; Samuels y Paterson, 1995; Khachatourians, 1996; James *et al.*, 2003).

### **1.8.2. Sistema inmune innato**

La segunda línea de defensa de los insectos la constituye el sistema inmune innato conformado por el sistema celular y el sistema humoral, capaz de reaccionar ante la invasión de patógenos diferenciando lo propio de lo extraño. En este proceso participan los sistemas de reconocimiento de patrones moleculares característicos de polisacáridos microbianos presentes en la pared celular como: peptidoglicanos, abundantes en bacterias Gram (+); liposacáridos en la membrana externa de bacterias Gram (-) y finalmente  $\beta$  1,3 glucanos en la pared celular de los hongos.

El sistema humoral utiliza proteínas antibióticas y otras moléculas efectoras que circulan en el hemocele y/o cutícula con la finalidad de inactivar los agentes patógenos que accedan al interior del insecto. Se ha descrito que los insectos sintetizan moléculas con acción biocida específica tales como cecropinas, defensinas, atacinas, lisozimas, entre otros. (Boman *et al.*, 1991). Aunque es un tema aún controvertido, se ha determinado la existencia de fenoloxidasas y hemaglutininas (lectinas) en la hemolinfa que podrían simular el papel de antígenos en combinación con proteínas depositadas en la superficie de los invasores. En algunos dípteros, el plasma de la hemolinfa se encarga de melanizar y encapsular los microorganismos invasores vía tirosina-fenoloxidasa sin que los hemocitos estén involucrados en la formación de la cápsula (Tanada y Kaya, 1993).

El sistema celular, por su parte, está compuesto por los hemocitos que circulan por el hemocele capaces de reconocer los elementos extraños mediante receptores tipo Toll que activan la producción de varios péptidos antimicrobianos (Levitin y Whiteway, 2008). Cuando la concentración de microorganismos patógenos es baja, la fagocitosis es el principal mecanismo para eliminar a los invasores. A concentraciones mayores, se forman agregados denominados nódulos. Existen evidencias que indican que las proPO (pro-fenoloxidasas) juegan un papel muy importante en este sistema, las cuales son enzimas clave para la síntesis de melanina, polímero que suele depositarse sobre los patógenos, formando los encapsulados (Marmaras *et al.*, 1996). Aunque se han clonado los genes que codifican para las fenoloxidasas de *Sarcophaga bullata* y *Apis mellifera* (Chase *et al.*, 2000; Lourenço *et al.*, 2005), el estudio de estas enzimas aún es limitado; sin embargo, el interés por dilucidar el papel de estas enzimas durante la respuesta inmune en los insectos ha cobrado importancia en los últimos años (Kan *et al.*, 2008).

### **1.8.3. Otras estrategias de defensa**

Como parte de la constante lucha por la supervivencia, algunos insectos son capaces de mejorar sus habilidades de defensa contra patógenos de acuerdo a la densidad de sus poblaciones. Bajo tales circunstancias, la selección natural favorece a aquellos individuos que usan señales asociadas a la densidad de población para desarrollar mecanismos de defensa óptimos. Como consecuencia, los individuos que crecen hacinados son más resistentes que aquellos que se desarrollan en condiciones de baja densidad. Este fenómeno denominado “profilaxis dependiente de la densidad”

(Wilson y Reeson, 1998) se da principalmente en insectos que presentan polifenismo, como la langosta del desierto *Schistocerca gregaria*. Se observó que cuando estos insectos se desarrollan en condiciones de hacinamiento son significativamente más resistentes al hongo *M. anisopliae* que langostas solitarias, debido a una actividad antimicrobiana potenciada en sus sistemas de defensa (Wilson *et al.*, 2002). Los insectos también son capaces de modificar su comportamiento con el propósito de luchar contra los agentes patógenos, tal es el caso de la langosta *Locusta migratoria* que al ser infectada por *M. anisopliae* incrementa su temperatura corporal por exposición al sol deteniendo el desarrollo de las blastosporas del hongo y facilitando la acción de los hemocitos de su sistema inmune (Ouedraogo *et al.*, 2003).

En el caso de los insectos sociales, éstos han desarrollado múltiples adaptaciones de conducta o comportamiento para evitar o combatir las infecciones por parásitos y patógenos. El primer caso de adaptaciones del comportamiento social consiste en remover a los miembros de la colonia con signos de enfermedad (Richard *et al.*, 2008).

En el caso particular de las abejas, además de reconocer y remover a individuos enfermos, son capaces de producir una “fiebre social”, donde las obreras se aglomeran e incrementan la temperatura en torno a larvas enfermas con el propósito de eliminar a los patógenos (Starcks *et al.*, 2000). Una segunda modificación del comportamiento se produce en los propios individuos enfermos para reducir la transmisión de la enfermedad, manteniéndose fuera de los nidos o alejados de las larvas o de la reina. Finalmente, una tercera modificación del comportamiento consiste en una interacción social alterada de grupos de individuos sanos con individuos infectados. El incremento del contacto de individuos sanos con los enfermos puede resultar en una “vacunación” colectiva de los individuos sanos, incrementando su inmunidad (Richard *et al.*, 2008).

### **1.9. Caracterización e identificación de hongos entomopatógenos**

La caracterización de los hongos entomopatógenos, tanto a nivel morfológico, fisiológico y molecular, es considerada una etapa primordial para la selección de especies fúngicas como agentes de control biológico de insectos (Sosa-Gómez y Alves, 1983, 1984; Tigano-Milani *et al.*, 1995 a, b; Boucias *et al.*, 2000).

La caracterización morfológica consiste en el estudio de las estructuras macroscópicas (el aspecto y color de las colonias y la velocidad de crecimiento en

medios artificiales) y microscópicas (la forma y tamaño de las hifas, conidióforos, fiálides y conidios). Especialmente, la forma y tamaño de los conidios son utilizados para la identificación de las especies de *Isaria*, *Beauveria* y *Metarhizium* (Tzean *et al.*, 1997, Humber, 1997, 2002; Samson *et al.*, 1988). Esta forma de caracterización permite identificar las especies de hongos entomopatógenos y en algunos casos, seleccionar cepas o variedades que se diferencian entre sí en algunos caracteres morfológicos, tales como, la velocidad de crecimiento, el porcentaje de germinación y la virulencia, (Tanada y Kaya, 1993). Sin embargo, debido al carácter pleomórfico de algunas especies es común observar variaciones morfológicas de las células conidiogénicas y sus conidios y, por lo tanto, su caracterización e identificación se torna imprecisa.

La caracterización por técnicas moleculares consiste en el análisis de las isoenzimas o de los ácidos nucleicos, con el fin de estudiar la diversidad genética que existe entre las poblaciones de hongos entomopatógenos (Lecuona, 1996).

Las isoenzimas se generan cuando una mutación en un gen estructural se traduce en una modificación de un aminoácido y pueden ser reveladas en la medida que la proteína mutante difiera de la original en cuanto a su carga, conformación o punto isoeléctrico. El análisis isoenzimático ha permitido caracterizar la variabilidad genética intraespecífica en *Nomuraea rileyi* (Joslyn y Boucias, 1980), *Hirsutella thompsonii* (Boucias *et al.*, 1982), *Conidiobolus obscurus* (Latge y Boucias, 1984) y *Beauveria bassiana* (Poprawsky *et al.*, 1988; St. Leger *et al.*, 1992).

Por otra parte, se han desarrollado una amplia gama de técnicas moleculares que permiten el análisis de los ácidos nucleicos. Entre ellas se destaca la “reacción en cadena de la polimerasa” (Polymerase Chain Reaction, PCR), la cual consiste en la amplificación de secuencias de ADN en presencia de “cebadores” (*primers*), ADN polimerasas y los precursores del ADN (dideoxinucleótidos). El principio de la PCR radica en tres pasos secuenciales que son repetidos entre 25 a 40 veces: el primer paso es la desnaturalización del ADN a 92 – 96 °C, seguido de un paso de apareamiento de los “*primers*” a la simple hebra de ADN realizado a 35 – 65 °C y, finalmente, un paso a 72 °C en donde ocurre la extensión de la molécula de ADN mediante la incorporación de los precursores (Mullis *et al.*, 1986).

La caracterización de los hongos entomopatógenos es llevada a cabo por dos tipos de métodos basados en la PCR: los métodos inespecíficos y los métodos específicos (Meyling, 2008). Dentro de los primeros, se encuentra la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), la cual consiste en la amplificación al azar de

regiones de ADN mediante la utilización de *primers* cortos e inespecíficos. Esta técnica fue ampliamente utilizada para estudiar la variabilidad genética inter-específica e intra-específica de *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana* (Williams *et al.*, 1990; Tigano-Milani *et al.*, 1995 a, b; Cantone y Vandenberg, 1998; Bidochka *et al.*, 1994; Obornik *et al.*, 1999; Becerra *et al.*, 2007). Los métodos de PCR específicos son: PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), que consiste en la amplificación de regiones específicas de ADN y la digestión de éstas con enzimas de restricción; y el método de ISSR (Inter-Simple-Sequence-Repeats) que se desarrolla a partir de la amplificación de Secuencias Simples Repetitivas (SSR) del genoma, formadas por una secuencia de 6 nucleótidos repetida varias veces en tandem (microsatélites). Ambas técnicas generan un perfil de múltiples bandas de ADN, el cual es comparado para determinar la variabilidad genética (Meyer, 1991; Zietkiewicz *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 2002; Jensen y Eilenberg, 2001; Wang *et al.*, 2005).

Además, la amplificación de genes específicos por PCR y el secuenciamiento de éstos permite estudiar las relaciones filogenéticas entre varios taxones y dentro de los taxones. La amplificación de ADN ribosomal (ADNr), fue una de las primeras aplicaciones de la PCR en la micología (White *et al.*, 1990). Las secuencias de ADNr que codifican para la formación de ARN ribosómico, son encontrados universalmente en células vivas y se presentan como un “cluster” génico, el cual es repetido en “tandem” centenas de veces. Cada unidad de repetición (cluster génico) incluye 3 genes: ADNr 18S, ADNr 5,8S y ADNr 28S, los cuales son separados por dos regiones denominadas “espaciadores transcriptos internos” (ITS). Debido a que los genes 18S y 28S presentan regiones altamente conservadas, se diseñaron *primers* universales para la amplificación de la región comprendida entre el ITS1, 5,8S y el ITS2 de cualquier especie fúngica (Driver *et al.*, 2000). Los análisis comparativos de las secuencias de nucleótidos de los genes del ADN ribosomal y los ITS permitieron clarificar las relaciones filogenéticas entre varios hongos entomopatógenos (Bowman *et al.*, 1992; Hibbett, 1992; Bidochka *et al.*, 1999; Driver *et al.*, 2000; Inglis y Tigano, 2006).

En el campo de la taxonomía resulta importante comparar los resultados obtenidos por la caracterización morfológica y por las técnicas moleculares, para generar una mayor precisión en la identificación de los aislamientos fúngicos y analizar su variabilidad genética entre las poblaciones de los hongos entomopatógenos.

### 1.10. Característica de la especie *Beauveria bassiana*

El género se caracteriza por presentar un micelio blanco, conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene el conidio, la cual se presenta en forma de zig-zag, después de que varios conidios se producen; los conidios son hialinos, redondeados a ovoides y unicelulares (Bustillo, 2001). *B. bassiana* posee conidios de globosos a subglobosos (2-3 x 2.0-2.5  $\mu\text{m}$ ) y los conidióforos forman densos grupos (Samson *et al.* 1988). Las colonias crecen de 0,6-2,3 cm en 8 días a 20 °C, de color blanco con una apariencia pulverulenta con abundantes conidios (Domsch y Gams, 1980). La germinación de los conidios requieren de una temperatura óptima de 25-30 °C (mínimo de 10° C y máximo de 30° C), el pH óptimo para su crecimiento es de 5,7-5,9 y para la formación de conidios de 7-9 (Domsch y Gams, 1980).

*Beauveria bassiana* es conocido como el hongo causante de la enfermedad “muscardina blanca”. Este término fue empleado por los biólogos franceses para describir un número de enfermedades fúngicas que transforman algunos insectos en momias blancas con un aspecto similar al algodón; el hongo responsable de causar dicha enfermedad es *B. bassiana* (Steinhaus, 1985).

El género *Beauveria* está compuesto por varias especies: *B. bassiana*, *B. brongniartii* o *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. velata*, sin embargo las más frecuentemente estudiadas son *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *B. brongniartii* (De Lacroix) Siemszko (Bustillo, 2001).

### 1.11. Característica de la especie *Metarhizium anisopliae*

El género *Metarhizium* se caracteriza por presentar conidióforos que forman una capa de esporas, las fialides pueden ser solas, en pares o agrupadas en racimos, los conidios se producen en cadenas de conidios basípetos compactados en columnas, son ovoides o cilíndricos. *Metarhizium anisopliae* posee dos variedades que se diferencian principalmente por el tamaño de sus conidios: la variedad más común *anisopliae* de conidios pequeños (3,5-9,0  $\mu\text{m}$ ) y la variedad *major* de conidios grandes (9,0-18  $\mu\text{m}$ ) (Kirk *et al.*, 2001; Domsch y Gams, 1980). Las colonias crecen lentamente alcanzando hasta 2 cm en 10 días a 20 °C sobre medio de cultivo. Tienen un óptimo crecimiento a

una temperatura de 25 °C y pueden crecer en un rango de pH de 3,3-8,5; se requiere de una alta humedad para que se desarrollen los conidios (Domsch y Gams, 1980).

En el género *Metarhizium* se han reportado nueve especies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. globosum*, *M. robertsii* y *M. brunneum* (Bischoff *et al.*, 2009)

### **1.12. Características de la especie *Purpureocillium lilacinum***

El género presenta hifas hialinas a amarillentas, septadas, de paredes delgadas. La mayoría presenta ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de fiálides, las cuales pueden ser también solitarias. Las fiálides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. Los conidioforos son ramificados, agrupados o irregulares. Los conidios se encuentran agrupados en forma de cadena. Presentan un rápido crecimiento de sus hifas. El conidióforo presenta grupos de ramificaciones laterales, cada una de las cuales presenta de 2 a 4 divisiones ovaladas antes de los conidios. Estos últimos tienen una longitud de 2,5-3,0 µm de largo y de 2,0-2,2 µm de ancho y presentan coloración lila (Samson, 1975). Las colonias crecen de 5-7 cm en 14 días a 25 °C presentando un color lila. El crecimiento óptimo para el desarrollo del microorganismo ocurre en un rango de 26-30 °C, con un pH de 2-10 (Domsch y Gams, 1980).

### **1.13. Factores que influyen en el establecimiento y acción de hongos entomopatógenos**

Los factores ambientales cumplen una función esencial en la iniciación y desarrollo o en la prevención y supresión de las epizootias naturales afectando las condiciones fisiológicas del hospedante, su densidad y distribución espacial y temporal. La temperatura y humedad relativa constituyen un complejo de factores que interactúan entre sí con otros componentes del ambiente. El mayor problema es que pocos estudios se refieren al microclima del cultivo que es el que directamente influye sobre los patógenos. A diferencia de las condiciones constantes en el laboratorio, en el

agroecosistema se presentan situaciones normalmente fluctuantes del conjunto de factores climáticos. Esto explica la complejidad del tema y las múltiples interacciones posibles como para poder cuantificar, con más precisión, el efecto del microclima natural sobre los entomopatógenos (Lecuona, 1996).

Los principales factores ambientales que afectan la eficiencia de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico son: humedad relativa, temperatura y radiación solar.

### **1.13.1. Humedad Relativa (HR)**

La humedad relativa es un factor de gran importancia, tanto para el hospedante como para el patógeno. Es indispensable en las diferentes fases del ciclo de las relaciones entre ambos organismos. Tiene efecto sobre la germinación, penetración y para la reproducción de los hongos entomopatógenos. La falta de humedad relativa adecuada puede perjudicar una epizootia (Lecuona, 1996). Se requiere de humedad relativa alta para la germinación del hongo entomopatógenos *M. anisopliae*. El estudio de Walstad *et. al.*, 1969 indica que la mayor germinación ocurre al 100% de humedad relativa y disminuye a 0 al 85% de HR. Niveles altos de HR son necesarios para la esporulación. A un nivel de HR del 100% la esporulación ocurrió en cuatro días, pero a una HR de 92,5% fueron necesarios cinco o más días, mientras que la esporulación fue inhibida con humedad relativa menor del 90% (Nirula, 1957; Schaerfenberg, 1964; Walstad *et. al.*, 1969; Ferron, 1978, Sosa-Gómez y Alves 2000).

### **1.13.2. Temperatura (T)**

La temperatura puede afectar la estabilidad de los patógenos en el almacenamiento, durante las aplicaciones en el campo y en su ocurrencia natural en el agroecosistema. Los entomopatógenos no poseen condiciones biológicas para defenderse de las grandes variaciones de temperatura, y puede ser limitante para varios microorganismos. El rango favorable de temperatura para los diferentes grupos de entomopatógenos varía entre 20 y 30 °C, sin embargo, existe una temperatura ideal para cada patógeno y para cada fase del ciclo de la relación con su hospedante. La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes para los hongos entomopatógenos, debido a que puede afectar la germinación de las esporas, el

desarrollo y penetración del tubo germinativo y la colonización y reproducción. Los requerimientos térmicos de los hongos entomopatógenos son variables en función de la especie, cepa y fase de desarrollo. El desarrollo de las enfermedades fúngicas en los insectos puede ser perjudicado por temperaturas superiores a 30 °C (Lecuona, 1996). Las esporas de hongos entomopatógenos germinan a temperaturas entre 15 y 35 °C, siendo el rango óptimo entre 25 y 30 °C. La esporulación es inhibida a temperaturas inferiores de 10 °C y superiores a 35 °C (Nirula, 1957; Schaerfenberg, 1964; Walstad *et al.* 1969; Ferron, 1978, Sosa-Gómez y Alves 2000).

### **1.13.3. Radiación solar (RS)**

Para evaluar el efecto de la radiación solar sobre los patógenos y sobre la ocurrencia de las enfermedades es necesario considerar los siguientes aspectos: espectro de luz visible con sus diferentes longitudes de onda (luz verde, amarilla, azul, etc.), fotoperíodo y faja de luz ultravioleta germicida (Lecuona, 1996). La exposición a la luz ultravioleta puede ser letal para los conidios de los patógenos (Alves, 1986). Steinhaus (1949) citado por Nirula (1957) observó que el crecimiento y esporulación de los hongos es retrasado por la radiación solar y que la nubosidad tiene un papel importante en el desarrollo de las epizootias causadas por hongos entomopatógenos.

### **1.13.4. Suelo**

El suelo puede abrigar tanto a los insectos como a los entomopatógenos y es un ambiente complejo donde los microorganismos sufren la acción de los factores bióticos y abióticos, que dan como resultado una mayor o menor permanencia de acuerdo a las condiciones de campo. Los hongos entomopatógenos pueden vivir en el suelo por periodos variables. *M. anisopliae* después de parasitar insectos puede permanecer colonizando el cadáver por un período relativamente largo a la espera de un nuevo hospedante. La mayor parte de sus conidios difícilmente conseguirán sobrevivir por más de tres meses en los diferentes tipos de suelo.

### **1.13.5. Los agroquímicos y su efecto sobre los entomopatógenos**

La susceptibilidad de los entomopatógenos a los agroquímicos puede variar de acuerdo con el grupo y cepa del patógeno, con la naturaleza química del producto y con la dosis empleada. Existen sustancias que son letales para los microorganismos, otras poseen efecto fungistático o bacteriostático y finalmente, productos que en dosis normales y/o subletales pueden favorecer su crecimiento, reproducción y virulencia. Esto demuestra la importancia de conocer la acción de los agroquímicos sobre las diferentes fases del desarrollo de los entomopatógenos (Alves, 1986; Lecuona, 1996).

#### **1.14. Los hongos entomopatógenos como agentes potenciales de control biológico**

Las infecciones naturales causadas por los hongos entomopatógenos juegan un rol preponderante en el control de muchas plagas. Ocasionalmente, la mortalidad alcanza niveles elevados causando epizootias y provocando una notable disminución en las poblaciones de las plagas. Sin embargo, en ocasiones puede ser necesario incrementar su incidencia en forma artificial mediante la inoculación de los hongos entomopatógenos para aumentar su efecto insecticida. Por lo tanto, dentro del control biológico se plantea como una alternativa la introducción inoculativa o inundativa de éstos hongos en forma de productos comerciales o artesanales.

Además, en los últimos años aumentó la exigencia de productos alimenticios de mejor calidad, ocasionando un crecimiento de la agricultura orgánica, que se basa en el uso de productos naturales de bajo impacto ambiental. En función de esto, se generó un gran interés en la utilización de los hongos entomopatógenos en el control biológico de plagas y, por lo tanto, surgieron pequeñas industrias, laboratorios e instituciones que focalizaron sus investigaciones en la búsqueda y selección de aislamientos fúngicos con elevada producción de conidios y virulencia, como así también, en los métodos de producción a gran escala, la formulación y la aplicación en cultivos de importancia económica (Ignoffo 1981; Ferron, 1985; Landa *et al.*, 1994; Jenkins *et al.*, 1998).

Hasta el momento, se han utilizados alrededor de 20 especies de hongos entomopatógenos en el control biológico clásico (Hajek y Delalibera, 2010). Las especies del Phylum Ascomycota, orden Hypocreales, son las más utilizadas, ya que tienen un amplio rango de insectos hospedadores y su manipulación en cultivos *in vitro* y en fermentaciones sólidas es relativamente fácil (Murrin, 1996). Los hongos del Subphylum Entomophthoromycotina, Orden Entomophthorales, son buenos candidatos

para el control biológico debido a su estricta especificidad, a su capacidad de generar epizootias y al desarrollo de esporas de resistencia, sin embargo, su crecimiento es reducido en cultivos *in vitro* y no pueden ser producidos a gran escala (Pell *et al.*, 2001; Papierok, 2007). Unos pocos programas de control biológico están siendo empleados para controlar las poblaciones de insectos del Orden Hemiptera, Coleoptera y Lepidoptera mediante la introducción de hongos entomopatógenos. Estos programas se están desarrollando mayoritariamente en áreas de America del Norte y las islas del Pacífico y en menor medida en America Latina (Hajek y Delalibera, 2010).

En el Brasil, más de 20 géneros ocurren naturalmente sobre insectos de importancia económica, siendo los más importantes *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin; *B. bassiana* (Bals.) Vuill.; *N. rileyi* (Farlow) Samson; *Lecanicillium* (Zimm.) Viègas; *Isaria* Samson; *Aspergillus* Michelli; *Fusarium* Link (Atractium) y *Cladosporium* (Fresen.) (Alves, 1998; Shah y Pell, 2003).

En los cultivos de yerba mate, hay registros de epizootias naturales causadas por *B. bassiana* en diversos ordenes de insectos en el cultivo. Ribeiro (1993) realizó estudios en laboratorio para el control de *H. betulinus* testeando cinco cepas de *B. bassiana* aisladas de insectos encontrados en yerba mate. Los resultados más promisorios fueron obtenidos con la cepa 152, aislada a partir de insectos Chrysomelidae. La infectividad de este aislamiento bajo condiciones de laboratorio fue de 69,62% en adultos y 93,02% en larvas de *H. betulinus*. Dalla Santa (2000) probó la infectividad bajo condiciones de laboratorio, de una cepa de *B. bassiana* aislada de orugas infectadas recolectadas en el campo, para el control de *Thelosia camina* (Lepidoptera: Eupteroidea) e *Hylesia* spp. (Lepidoptera: Saturniidae) siendo la mortalidad superior a 90 y 94%, respectivamente, después de 10 días, por el método de pulverización. Oliveira *et al.* (2000) testearon la patogenicidad de aislamientos de *B. bassiana* al ácaro rojo de la yerba mate *Oligonychus Yothersi* (Acari: Tetranychidae) provenientes del Instituto Biológico de São Paulo. La mortalidad de esta especie fue de 77 a 98% para todos los aislamientos.

Soares *et al.* (1995) y Soares e Iede (1997) detectaron la ocurrencia natural de los géneros *B. bassiana* y *M. anisopliae* en adultos de *H. betulinus*, en un yerbal del municipio de Ivaí, Paraná, Brasil. Para estos autores, cuando estos hongos son adecuadamente vehiculizados y aplicados, pueden presentar elevado potencial de control, bajo impacto ambiental y pocos residuos en el producto. Además de esto, pueden permanecer activos por largos períodos en el ambiente del cultivo. Estos

organismos se encuentran naturalmente en los yerbales, indicando, también su adaptación al ecosistema modificado. Leite *et al.* (2000) testearon, en laboratorio, siete cepas de *B. bassiana*, una de *B. brongniartii* (Sacc.) Petch y una de *M. anisopliae* obtenidas del Embrapa Recursos Genéticos. La cepa de *B. bassiana* CG 716, aislada de adultos de *H. betulinus* de campo, presentó los mejores resultados, con una mortalidad de 94,01 y 100% bajo condiciones de campo, con tiempo medio de mortalidad de 36 días. Leite *et al.* (2003) realizaron ensayos en laboratorio con pocas especies de hongos entomopatógenos, *B. bassiana* (cepa CG 716) y *Paecilomyces* sp., obtenidos de *H. betulinus* de campo. Se verificó que *B. bassiana* fue más infectivo, presentando una mortalidad de 97,5% contra 37,5% del segundo. Los tiempos medios de mortalidad fueron de 16,8 y 32 días para *B. bassiana* y *Paecilomyces* sp., respectivamente.

Leite *et al.* (2006b) probaron la cepa (CG 716), en campo, formulada en dos concentraciones de aceite emulsionable y tres concentraciones de conidios. El formulado más eficiente fue el de la concentración  $1 \times 10^7$  conidios/ml y 0,5% de aceite, obteniendo una infectividad de 76% de los insectos evaluados.

Sosa Gómez *et al.* (1994) informaron que en plantas de yerba mate, en Gobernador Virasoro, provincia de Corrientes, Argentina, se registraron niveles de infección de hasta 90% causados por el hongo *Zoophthora radicans* (Brefeld) sobre adultos de *G. spegazziniana*.

En el Brasil, Alves *et al.* (2009) citaron esta misma asociación, en un yerbal en Cascavel, Paraná, Brasil, con niveles semejantes de ocurrencia de la población, siendo los únicos registros de entomopatógenos sobre *G. spegazziniana*.

### 1.15. Inóculos de hongos entomopatógenos en el suelo

De acuerdo con Alves (1998) el suelo es el reservorio natural de los hongos entomopatógenos, por eso su empleo en programas de manejo integrado de plagas es condicionado a su eficacia y persistencia en el ambiente. Sin embargo, existen factores bióticos y abióticos que pueden ser responsables por la persistencia por largos períodos. Entre estos, los principales son la temperatura y la humedad (Lingg y Donaldson 1981; Studdert y Kaya 1990; Rath *et al.*, 1992); tipo de suelo (Storey *et al.*, 1989; Vänninen *et al.*, 2000); organismos antagónicos (Fargues *et al.*, 1983; Fargues y Robert, 1985) y la presencia del hospedero específico en condiciones naturales (Kessler *et al.*, 2003, 2004).

Lingg y Donalson (1981) estudiaron la estabilidad de *B. bassiana* en el suelo y observaron que la supervivencia de los conidios fue dependiente de la temperatura en ese ambiente. La vida media de los conidios varió de 14 días (25 °C y 75% de saturación de agua en el suelo) a 276 días (10 °C y 25% de saturación). Conidios mantenidos en humedades 0, 32, 52, 75 y 100 y bajas temperaturas no sufrieron reducción en su viabilidad. Sin embargo, humedades arriba citadas y altas temperaturas (55 °C) no se pudieron observar unidades formadoras de colonias (UFC). Según Quintela (1986) ocurre menor supervivencia de los conidios de este hongo cuanto más elevada es la temperatura y porcentaje de saturación de agua en el suelo; observó también que el suelo cubierto con vegetación propicia mayor protección para este patógeno.

El tipo de suelo puede ejercer efecto significativo en la supervivencia de los conidios (Prado, 2001). Lanza *et al.* (2004) verificaron que el tipo de suelo influyó significativamente la supervivencia del hongo, siendo que la menor cantidad de UFC fue encontrada en el suelo latosólico de textura arcillosa. Corrêa y Azevedo (1986) también verificaron que los suelos arcillosos son menos favorables que los arenosos para la mantención de la viabilidad de los conidios de *M. anisopliae*.

Quintela *et al.* (1992) evaluaron la supervivencia de los conidios de *B. bassiana* aplicado en tierra estructurada latosólico eutrófica en suelo desnudo y con planta. En ambos, las UFC fueron recuperadas después de 94 días de evaluación; sin embargo, suelos con cobertura propician mayor protección al hongo.

La microbiota del suelo también es un agente importante en la supervivencia de los hongos (Sharapov y Kalvish, 1984; Shields, 1981). Según Alves (1998) después de la aplicación del hongo en el suelo ocurre un rápido aumento en su población, seguido por un decrecimiento y después de semanas o meses desaparece completamente debido a la acción de los organismos antagonistas y otros factores.

Gama *et al.* (2005) mencionaron que ocurre mayor conidiogénesis de hongos sobre los cadáveres de insectos o la formación de nuevos propágulos a partir del inóculo existente en el suelo. Por esto, diversos hongos entomopatógenos pueden sufrir reducciones en su densidad en ausencia del hospedero, como ejemplos *B. bassiana* (Gaugler *et al.*, 1989; Storey *et al.*, 1989), *B. brongniartii* (Kessler *et al.*, 2004), *N. rileyi* (Ignoffo *et al.*, 1978), *P. fumosoroseus* (Fargues y Robert, 1985). *Metarhizium anisopliae* es conocido por su gran persistencia, a pesar de la ausencia del hospedero,

pudiendo ser atribuido la presencia de otros hospedadores susceptibles en el suelo (Vänninen *et al.*, 2000).

Las informaciones sobre la acción de los hongos entomopatógenos sobre *H. betulinus*, aún son restringidas, existiendo una brecha de datos a lo que se refiere a las epizootias, persistencia y presencia de inóculos en el suelo.

**HIPÓTESIS:**

Las especies de hongos entomopatógenos nativos presentan en general mayor especificidad para los hospedadores de los cuales fueron aislados originalmente y además se adaptan mejor a las condiciones ambientales del lugar de origen, que los hongos patógenos procedentes de hospedantes y lugares diferentes.

**OBJETIVO GENERAL:**

Estudiar la diversidad y patogenicidad de hongos patógenos de insectos plaga de la yerba mate en la región del Noreste Argentino.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1) Relevar, aislar e identificar los hongos entomopatógenos de insectos plaga en cultivos de yerba mate y suelos de importancia en la región del NEA (Misiones).
- 2) Estimar la patogenicidad de los hongos entomopatógenos aislados e identificados en condiciones controladas de laboratorio.
- 3) Preservar los cultivos fúngicos obtenidos en una colección de cultivos de referencia.
- 4) Caracterizar los hongos entomopatógenos mediante técnicas de biología molecular.



# *Materialiales y Métodos*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Área de Estudio

El área de estudio abarcó distintos sitios ubicados en la región biogeográfica correspondiente a la provincia de Misiones, Argentina. Los ambientes en los cuales se llevaron a cabo los relevamientos fueron cultivos de yerba mate comerciales (convencional y orgánico), incluyendo las localidades de Santa Inés, Candelaria, Apóstoles, Jardín América, Campo Ramón, Oberá, Santo Pipo, Leandro N. Alem, Ruiz de Montoya y Colonia Aurora (Tabla1) (Figura 4).

La localización geográfica de cada establecimiento se determinó con un instrumento de posicionamiento geográfico (GPS, Etrex Garmin ® Corporation).

Los datos de temperatura y humedad fueron tomados *in situ* en cada oportunidad utilizando un termohigrómetro digital (TFA®, Alemania). Los datos climáticos de las temperaturas medias diarias, humedad relativa y promedio mensual de precipitaciones fueron obtenidos del Servicio Meteorológico Nacional (SMN).

**Tabla 1. Sitios de muestreo, tipos de producción y ubicación geográfica.**

Establecimiento	Características de Producción	Localidad	Provincia	Coordenadas Geográficas	Fecha de Muestreo
Sitio 1	Orgánico	Santa Inés	Misiones	27° 31' 32.13" S 55° 51' 43.70" O	2008-2010
Sitio 2	Convencional	Jardín América	Misiones	27° 3' 8.06" S 55° 14' 38.34" O	2008-2010
Sitio 3	Convencional	Candelaria	Misiones	27° 28' 18.85" S 55° 45' 18.83" O	2008-2010
Sitio 4	Convencional	Colonia Aurora	Misiones	27° 28' 39.20" S 54° 45' 31.34" O	06/01/2009
Sitio 5	Convencional	Oberá	Misiones	27° 23' 58.49" S 55° 8' 28.28" O	04/02/2009
Sitio 6	Convencional	Santo Pipo	Misiones	27° 8' 28.97" S 55° 24' 34.45" O	15/02/2009
Sitio 7	Convencional	Apóstoles	Misiones	27° 55' 10.19" S 55° 44' 11.01" O	25/06/2009
Sitio 8	Convencional	Apóstoles	Misiones	27° 54' 24.49" S 55° 46' 28.76" O	30/06/2009
Sitio 9	Convencional	Oberá	Misiones	27° 28' 33.88" S 55° 4' 11.97" O	20/12/2009
Sitio 10	Convencional	Jardín América	Misiones	27° 24' 34.45" S 55° 13' 11.67" O	03/01/2010
Sitio 11	Convencional	Leandro N. Alem	Misiones	27° 38' 7.64" S 55° 20' 40.93" O	17/01/2010
Sitio 12	Convencional	Santa Inés	Misiones	27° 34' 9.57" S 55° 50' 44.11" O	2008-2010
Sitio 13	Convencional	Ruiz de Montoya	Misiones	26° 57' 54.78" S 55° 5' 24.36" O	09/03/2010
Sitio 14	Convencional	Colonia Liebig	Corrientes	27° 54' 02.64" S 55° 45' 00.90" O	25/03/2010
Sitio 15	Convencional	Campo Ramón	Misiones	27° 27' 18.27" S 55° 1' 27.02" O	14/05/2010



**Figura 4. Cultivos de yerba mate en diferentes localidades de la provincia de Misiones. A. Colonia Aurora. B. Santa Inés. C. Apóstoles. D. Jardín América. E. Campo Ramón. F. Leandro N. Alem.**

## 2.2. Frecuencia de muestreo

En los establecimientos 1, 2, 3 y 12 los muestreos fueron realizados una vez cada 15 días, desde mayo de 2008 hasta septiembre de 2010. Asimismo, los otros establecimientos fueron visitados con diferente periodicidad durante el estudio (Tabla 1).

El muestreo consistió en la búsqueda de daños e insectos asociados al daño, en plantas de yerba mate que presentaban síntomas de problemas fitosanitarios ocasionados por insectos. En cada muestreo se hizo una prospección de la plantación, con una duración aproximada de 3 horas. Fueron analizados 50 árboles, escogidos aleatoriamente, a través de inspección visual, permitiendo el relevamiento de individuos de “taladro o tigre de la yerba mate” (*H. betulinus*) y “rulo o psilido de la yerba mate” (*G. spegazziniana*).

## 2.3. Recolección de insectos y detección de infecciones

En cada establecimiento, se recolectaron estadios juveniles y adultos de *H. betulinus* y *G. spegazziniana*. Los insectos recolectados de *H. betulinus* se conservaron en recipientes de plástico con tapa de 5 cm de altura y 5 cm de diámetro y con capacidad de 120 ml, los cuales fueron rotulados y en los que se colocó ramas de yerba mate como sustrato alimenticio. En cambio, para la recolección de *G. spegazziniana* fueron cortadas ramas con rulo o agallas de yerba mate las cuales fueron colocadas en bolsas de polipropileno.

Todos los insectos recolectados se llevaron al laboratorio donde fueron mantenidos bajo condiciones de hacinamiento, para estimular la expresión de las infecciones fúngicas latentes que pudieran haber adquirido en el campo (Medelin, 1963; Shah et al., 1997). Las larvas de *H. betulinus* se mantuvieron en una cámara de cría bajo condiciones controladas (25 °C y 80-85% HR) durante aproximadamente 7 días. Los adultos de *H. betulinus* y *G. spegazziniana* se colocaron en jaulas separadas acondicionadas a 25 °C y 80-85% HR. Se efectuaron observaciones cada 24 hs y se retiraron los cadáveres colocándolos en cámaras húmedas (cápsulas de Petri esterilizadas conteniendo papel de filtro humedecido con agua destilada estéril),

manteniéndolos en incubadora a 25 °C en oscuridad para favorecer la emergencia del micelio fúngico. Los insectos muertos en estas condiciones fueron observados durante 72 hs, al término de las cuales fueron descartados aquellos que no presentaron evidencia externa de infección. Los insectos fueron depositados como material de herbario de referencia en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) y en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), para la identificación taxonómica y el registro del ejemplar *voucher*.

## **2.4. Aislamiento de los hongos entomopatógenos**

### **2.4.1. Aislamiento a partir del insecto infectado**

Los individuos que desarrollaron síntomas de infección fúngica fueron removidos del material del campo utilizando una aguja entomológica estéril y se inocularon directamente en cápsulas de Petri conteniendo medio de cultivo Sabouraud dextrosa agar suplementado con extracto de levadura 1% (SDYA) o medio agar extracto de malta suplementado con 2% de extracto de levadura (MEA). Los medios de cultivo contenían antibióticos (gentamicina y cloranfenicol) (Anexo) para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes. Una vez obtenidos los aislamientos puros, estos fueron transferidos a tubos de vidrio con medio de cultivo SDYA 1% en estría para ser mantenidos a 4 °C, hasta su utilización.

### **2.4.2. Aislamiento monospórico a partir de muestras de suelo**

Se tomaron muestras de suelo de los establecimientos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 13 y 15. De cada uno de los establecimientos se extrajeron 3 muestras de suelo de una profundidad de 0-20 cm, correspondiendo a la parte central y a los laterales del yerbal. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas de polipropileno y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su utilización. Posteriormente se hizo una muestra compuesta mezclando las 3 submuestras (Figura 5).



**Figura 5. Muestras de suelo de cultivos de yerba mate.**

Las tres submuestras de suelo de 0-20 cm de profundidad fueron almacenadas en bolsas de polipropileno para luego ser procesadas en el laboratorio.

Se empleó la metodología de aislamientos monospóricos por dilución seriada (Lecuona, 1996) y se la modificó de la siguiente manera: se suspendieron 10 gr de cada muestra en 90 ml de agua destilada dentro de un erlenmeyer, posteriormente se transfirió 1 ml de esta solución madre a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril. Se agitó mediante el uso de un vórtex durante 1 minuto y se repitió esta operación 5 veces más (en total seis diluciones). De las últimas tres diluciones se sembraron 100  $\mu$ l de la última dilución en cápsulas de Petri de 10 cm de diámetro conteniendo medio de cultivo selectivo con Dodine (acetato de N-dodecilguanidinio) (Doberski y Tribe, 1980) (Anexo), utilizando un ansa de Drigalsky (Figura 6). Asimismo, se utilizó como control positivo del medio selectivo un aislamiento de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. lilacinum* preservadas en la colección de hongos entomopatógenos del CEPAVE. Todas las cápsulas fueron incubadas a 25 °C en oscuridad por 10 días para favorecer el desarrollo de las estructuras fúngicas reproductivas. Las colonias obtenidas fueron luego repicadas a medio de cultivo SDYA para permitir la esporulación del hongo y poder confirmar su identidad mediante observación microscópica de sus estructuras reproductivas.



**Figura 6. Aislamiento fúngico a partir de muestras de suelo.**

Se suspendieron 10 gr de cada muestra de suelo en 90 ml de agua destilada, posteriormente se transfirió 1 ml a un tubo con 9 ml de agua destilada estéril. Se repitió esta operación 5 veces más. De las tres últimas tres diluciones se sembraron 100  $\mu$ l de la última dilución en cápsulas de Petri de 10 cm. de diámetro conteniendo medio de cultivo selectivo.

## **2.5. Procedimientos con cultivos fúngicos**

Los cultivos fúngicos fueron realizados bajo condiciones de esterilidad (cámara de flujo laminar), los medios de cultivo así como todos los materiales fueron esterilizados en autoclave tipo Chamberland a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

### **2.5.1. Ensayo de viabilidad**

Para determinar el porcentaje de germinación de cada aislamiento se realizó el ensayo de viabilidad (Lane *et al.*, 1988). Este ensayo consistió en realizar una suspensión de conidios en Tween 80 (Polisorbato de Sodio) 0,01% (v/v), y ajustar su concentración a  $1 \times 10^6$  conidios/ml mediante la utilización de un hemocitómetro (cámara de Neubauer). A su vez, se acondicionó una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril conteniendo en su interior un portaobjeto esterilizado con 500  $\mu$ l de medio de cultivo SDYA (espesor de

2mm) (Figura 7). Luego se inocularon 100  $\mu$ l de la suspensión de conidios sobre el medio de cultivo SDYA y se distribuyó homogéneamente sobre su superficie utilizando un ansa de Drigalsky. Cada cápsula de Petri se colocó en una cámara incubadora a 25° C en oscuridad durante 24 hs y se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados en el microscopio con contraste de fases (400x) (Olympus CH30). Se consideró un conidio germinado cuando el tubo de germinación alcanzó la mitad de la longitud de la espora. Para cada aislamiento se evaluó el porcentaje de germinación por triplicado y en cada cámara de viabilidad se contó un total de 600 conidios.



**Figura 7. Cámara de viabilidad.**

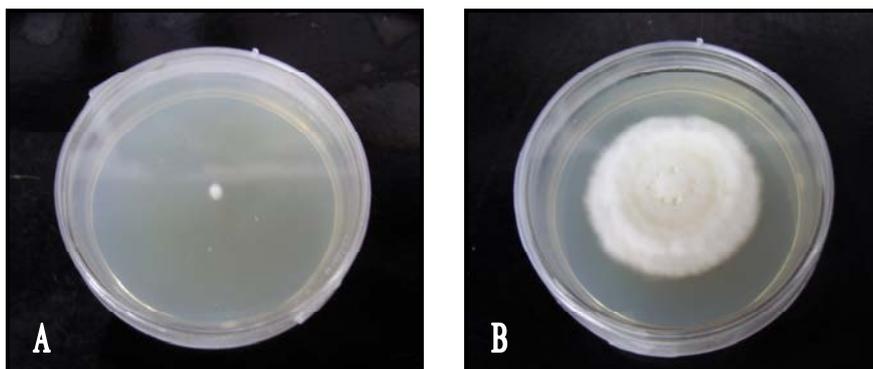
Cápsula de Petri conteniendo 2 portaobjetos limpios ubicados perpendicularmente, donde uno de ellos tiene una delgada capa de medio de cultivo SDYA. En la base se encuentra un papel de filtro humedecido con agua destilada estéril.

### **2.5.2 Determinación del crecimiento radial y tasa de crecimiento**

A partir de cultivos jóvenes de cada aislamiento fúngico (10 días de incubación a 25 °C) se cortaron cilindros de 4 mm de diámetro mediante la utilización de un sacabocados. Cada cilindro fue ubicado individualmente en el centro de una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro que contenía SDYA más 1% de extracto de levadura estéril (Figura 9). Cada aislamiento fúngico fue ensayado por triplicado y conservado en cámara incubadora a 25 °C en condiciones de oscuridad durante 10 días. Diariamente, se midió el diámetro de la colonia (Figura 8) empleando una regla milimetrada y los

valores obtenidos fueron indicados como crecimiento radial (Lacey y Brooks, 1997). La tasa de crecimiento se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de crecimiento diaria} = (\text{diámetro final} - \text{diámetro inicial}) / \text{número de días}$$



**Figura 8. Determinación del crecimiento radial de los hongos entomopatógenos.**

Se coloca un cilindro con un cultivo joven en el centro de una cápsula de Petri conteniendo SDYA estéril y diariamente se mide el diámetro de la colonia. **A.** Inicio del experimento donde se observa el cilindro con cultivo joven (tiempo cero). **B.** Desarrollo de una colonia luego de 10 días de incubación a 25 °C en oscuridad.

## **2.6. Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por caracteres morfológicos**

Los hongos aislados en cultivo *in vitro* fueron identificados a partir de la descripción macroscópica y microscópica de las estructuras vegetativas y reproductivas, para luego ser comparadas con claves taxonómicas. Para la identificación de las especies de Ascomycota se utilizaron las claves de Samson (1974), Samson *et al.* (1988), Tzean *et al.* (1997), Humber (1997) y Hodge (2006).

La caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos consistió en la descripción y medición de las estructuras fúngicas, como así también, determinar el crecimiento radial, la tasa de crecimiento y el porcentaje de germinación de los conidios.

### **2.6.1. Descripción macroscópica**

A partir de los aislamientos monospóricos obtenidos de cada especie fúngica, se observó el tipo de borde, el aspecto y color del envés y revés de la colonia. Asimismo, se midió el diámetro de las colonias luego de 10 días de incubación a 25 °C en condiciones de oscuridad y se estimó la tasa de crecimiento como el diámetro de la colonia por el tiempo de incubación (mm/día).

### **2. 6.2. Descripción microscópica**

Para la observación microscópica a partir de cultivos fúngicos esporulados se montó una pequeña porción de micelio en azul de algodón-lactofenol de Amann (0,01% p/v) (Anexo) para visualizar la forma y dimensiones de los conidios, células conidiógenas (fiálides) e hifas de cada aislamiento. Para esto se utilizó un microscopio óptico con contraste de fases (400x) (Olympus CH30) y se registró la observación mediante una cámara digital (Sony DSCP73). Para cada aislamiento se midieron 25 unidades como mínimo, y luego se obtuvo el promedio y el error estándar.

### **2.6.3. Análisis estadísticos**

Los valores de porcentaje de germinación de los conidios y la tasa de crecimiento fueron analizados estadísticamente con el programa Statgraphics Centurion 15.2 program (StatPoint, Inc. 2007). Los valores de porcentaje de germinación de los conidios fueron transformados con la función arcoseno. Las diferencias entre ellas se analizaron mediante el test de Student y un análisis de la varianza (ANOVA) con nivel de significancia del 95%. Finalmente, se realizó un test de Tukey (HSD) para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

## **2.7. Preservación de los cultivos fúngicos**

Los aislamientos fúngicos obtenidos fueron depositados en las siguientes colecciones micológicas:

- Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina.
- Laboratorio de Biotecnología Agrícola, UNIOESTE, Cascavel, Paraná, Brasil.

Las técnicas empleadas para preservar los cultivos en la colección micológica del CEPAVE fueron las siguientes:

### **2.7.1. En glicerol 10 % estéril**

A partir de un cultivo esporulado se cortaron cubos de 1 cm<sup>3</sup> y se colocaron dentro de tubos de microcentrifuga “Eppendorf” estériles de 1,5 ml conteniendo glicerol al 10% estéril. Estos tubos fueron mantenidos a -20 °C.

### **2.7.2. En agua destilada estéril**

Se cortaron cubos de 1 cm<sup>3</sup> de un cultivo esporulado y se colocaron dentro de tubos de centrífuga “Tubo tipo Falcon” de 15 ml de polipropileno esterilizados conteniendo 10 ml de agua destilada estéril. Cada tubo se conservó en la heladera a 4 °C.

### **2.7.3. En papel de filtro esterilizado**

Sobre el micelio de un cultivo esporulado se colocaron tiras de papel de filtro previamente esterilizado y secado. Estos cultivos fueron mantenidos a 25 °C durante 3 días para favorecer la adhesión de los conidios al papel. Luego, se removió el papel de filtro con ayuda de una pinza esterilizada y se dejaron secar por 30 minutos dentro del flujo laminar. Los papeles de filtro conteniendo los conidios fueron ubicados individualmente en tubos de microcentrifuga tipo Eppendorf de 1,5 ml esterilizados y luego conservados en la heladera a 4 °C.

### **2.7.4. Transferencias en cultivo o “repiques” sucesivos**

Los cultivos fúngicos esporulados presentes en placas de Petri o en tubos de vidrio “pico de flauta” se conservaron en la heladera a 4 °C.

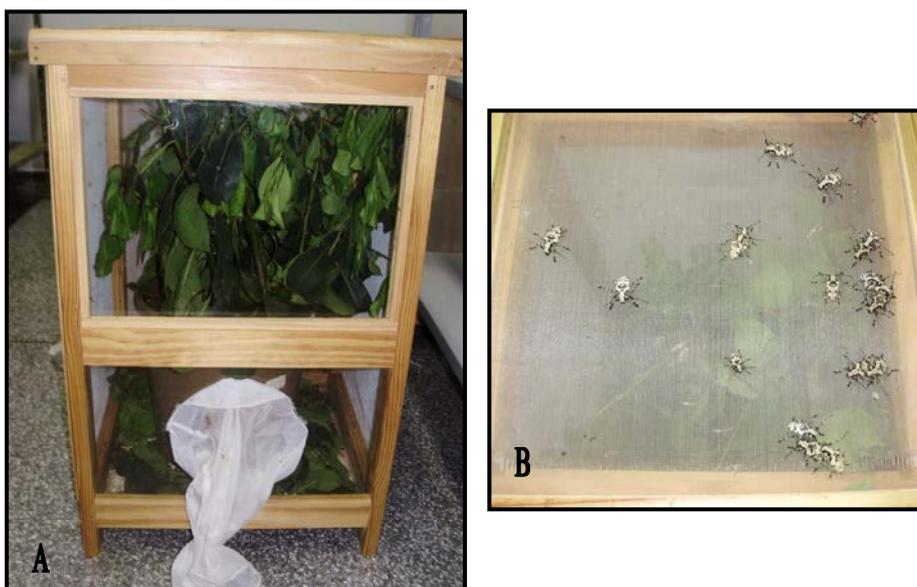
### **2.7.5. En sílica gel**

Un gramo de sílica gel no indicadora fueron colocados en tubos de microcentrífuga “Eppendorf” de 2 ml, esterilizados en autoclave tipo Chamberland a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. La suspensión de esporas se realizó en leche descremada estéril al 10% a partir de un cultivo fresco en medio agarizado. En condiciones de esterilidad se agregó 1 ml de suspensión de conidios a la sílica gel para garantizar que quedara solo humedecida. Cada tubo se conservó en heladera a 4 °C.

## **2.8. Cría de insectos para Bioensayos**

### **2.8.1. *Hedypathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae)**

En función de la dificultad de criar estos insectos en laboratorio, se recolectaron manualmente adultos de *H. betulinus* en un monocultivo de yerba mate comercial en de la ciudad de Ivaí, Paraná, Brasil (25° 01' 08'' S; 50° 85' 89'' O). En estas colectas se seleccionaron insectos adultos con pelos de coloración blanca, indicando la emergencia reciente del adulto, y sin ruptura de las antenas y piernas, según metodología de Leite *et al.* (2006). Los insectos fueron individualizados en recipientes de plástico de 11 x 8 cm, con la tapa perforada y transportados al Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidade Estadual do Oeste de Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil. Abundante número de insectos adultos provenientes del muestreo fueron colocados en jaulas de madera de 60 cm de altura x 40 cm de ancho x 40 cm de profundidad, los cuales fueron alimentados con ramas de yerba mate, hasta la realización de los experimentos, por un período no superior a los 30 días (Figura 9). Las jaulas fueron mantenidas en sala climatizada con temperatura de 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 14:10 luz/oscuridad y 70% de humedad relativa.



**Figura 9. Adultos de *H. betulinus* en condiciones de laboratorio.**

- A.** Jaulas de madera de 60 x 60 x 40 cm donde se colocaron ramas de yerba mate con adultos de *H. betulinus*. **B.** Adultos de *H. betulinus*.

### 2.8.2. *Gyropsylla spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae)

Debido a la dificultad para poder criar estos insectos en laboratorio, ramas de yerba mate con rulos o agallas cerradas fueron colectadas de yerbales comerciales de Cascavel, Paraná, Brasil y llevados al Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidade Estadual do Oeste de Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil (24°57' 21" S; 53° 27' 19" O) Las ramas con agallas cerradas fueron colocadas en un recipiente con agua, en el interior de jaulas de madera con medidas de 60 cm de altura × 40 cm de ancho × 40 cm de profundidad (Figura 10) y mantenidas en sala climatizada climatizada con temperatura de  $26 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 14:10 luz/oscuridad y 70% de humedad relativa.



**Figura 10. Colonias de *G. spegazziniana* en condiciones de laboratorio.**

Jaulas de madera de 60 x 60 x 40 cm donde se colocaron ramas de yerba mate con individuos de *G. spegazziniana*.

## **2.9. Ensayos de patogenicidad con hongos entomopatógenos realizados contra *H. betulinus***

### **2.9.1. Ensayos realizados con *H. betulinus***

Para la realización de los ensayos de patogenicidad fueron seleccionados 24 aislamientos fúngicos aislados de suelo de cultivos de yerba mate. 15 aislamientos de *B. bassiana*, 2 aislamientos de *M. anisopliae* y 7 aislamientos de *P. lilacinum* provenientes de los sucesivos muestreos de suelos de cultivos de yerba mate realizados durante el trabajo de tesis. Otra característica tenida en cuenta en la selección de los aislamientos fue el resultado obtenido en el porcentaje de viabilidad de los conidios *in vitro* de cada aislamiento fúngico, habiendo sido seleccionados aquellos que tuvieron un porcentaje de viabilidad superior a 90%.

### 2.9.2. Diseño experimental y obtención del inóculo

Los aislamientos fúngicos fueron multiplicados en medio de cultivo ME (Anexo) para la producción de conidios, en cápsulas de Petri, incubadas en cámara B.O.D ( $26 \pm 1$  °C, 14 hs de fotoperíodo), por un período de siete a diez días para el crecimiento vegetativo y conidiogénesis. Después de este período, los conidios fueron colectados por medio del raspaje del medio de cultivo, almacenándolos en tubos de vidrio por un período no superior a los 15 días a  $-10$  °C. Se preparó una suspensión de conidios en Tween 80 - polisorbato de sodio - (0,01% v/v) a partir de los cultivos fúngicos esporulados y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^8$  conidios/ml mediante el uso de un hemocitómetro del tipo cámara de Neubauer. Es preciso señalar, que previamente, se realizaron ensayos preliminares para determinar el método más adecuado para la aplicación del inóculo fúngico como así también la concentración a utilizar.

Para cada aislamiento fúngico se utilizaron 30 individuos adultos, dispuestos en grupos de 10 por réplica. La inoculación de los tratamientos se realizó sumergiendo individualmente a los insectos en la suspensión de conidios por 10 segundos y enseguida fueron transferidos a cápsulas de Petri con el fondo recubierto de papel de filtro para retirar el exceso de la suspensión de conidios. Luego, fueron transferidos a vasos de plástico conteniendo una rama de yerba mate y cerrados con tapa de plástico perforada. Fueron realizadas tres réplicas y un control para cada tratamiento. Los tratamientos controles fueron tratados de manera similar, aplicándoles únicamente una solución de Tween 80 (0,01% v/v) esterilizado, libre de conidios. Los tratamientos fueron mantenidos en condiciones controladas ( $26 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 14 hs de luz) (Figura 11).



**Figura 11. Ensayo de patogenicidad contra *H. betulinus*.**

Se sumergieron 30 adultos de *H. betulinus* en una suspensión fúngica ( $1 \times 10^8$  conidios/ml) o tween 80 0,01% (control). Los tratamientos fueron mantenidos bajo condiciones controladas ( $26 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 14 hs de luz) y diariamente se evaluó el porcentaje de mortalidad.

### **2.9.3. Tratamiento post inoculativo realizado en los ensayos de patogenicidad**

Los registros de mortalidad se realizaron cada 24 h hasta los 15 días posteriores a la inoculación. Los insectos muertos fueron retirados y esterilizados superficialmente en alcohol 70% y dos baños sucesivos en agua destilada estéril. Luego fueron colocados en cámaras húmedas, mantenidas en condiciones controladas ( $26 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 14 hs de luz), para la emersión del micelio del hongo. La confirmación de la mortalidad fue realizada mediante la visualización del insecto bajo el microscopio estereoscópico.

### **2.9.4. Análisis estadísticos**

La mortalidad de los controles fue corregida utilizando la Fórmula de Abbott (1925).

$$MC = \frac{(\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad control})}{(100 - \% \text{ mortalidad control})} \times 100$$

Los valores del porcentaje de mortalidad fueron transformados a arcoseno. Para determinar si las diferencias entre los distintos aislamientos fueron significativas se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con 95% de significancia, y luego un test de Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparar las medias entre pares de tratamientos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statgraphics Centurion 15.2 program (StatPoint, Inc. 2007).

Para cada tratamiento se calculó el porcentaje de mortalidad obtenido a los 15 días posteriores a la inoculación, como así también, se estimó el tiempo letal 50 ( $TL_{50}$ ) mediante el uso del programa Probit (Throne *et al.*, 1995).

## **2.10. Ensayos de patogenicidad con hongos entomopatógenos realizados contra *G. spegazziniana***

### **2.10.1. Ensayos realizados con *G. spegazziniana***

Para la realización de los ensayos de patogenicidad fueron seleccionados 25 aislamientos fúngicos: 17 aislamientos de *B. bassiana*, 2 aislamientos de *M. anisopliae* y 6 aislamientos de *P. lilacinum* provenientes de los muestreos de suelos de cultivos de yerba mate realizados durante el trabajo de tesis. Otra característica tenida en cuenta en la selección de los aislamientos fue el resultado obtenido en el porcentaje de viabilidad de los conidios de cada aislamiento fúngico, habiendo sido seleccionados aquellos que tuvieron un porcentaje de viabilidad superior a 90%.

### **2.10.2. Diseño experimental y obtención del inóculo**

Los aislamientos fúngicos fueron multiplicados en medio de cultivo ME (Anexo) para la producción de conidios, en cápsulas de Petri, incubadas en cámara B.O.D ( $26 \pm 1$  C, 14 hs de fotoperíodo), por un período de siete a diez días para el crecimiento vegetativo y conidiogénesis. Después de este período, los conidios fueron recolectados por medio del raspaje del medio de cultivo, almacenándolos en tubos de vidrio por un período no superior a los 15 días a  $-10$  °C. Se preparó una suspensión de conidios en Tween 80 (0,01% v/v) a partir de los cultivos fúngicos esporulados y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^9$  conidios/ml, mediante el uso de una cámara de

Neubauer. Cabe destacar, que previamente, se realizaron ensayos preliminares para determinar el método más adecuado para la aplicación del inóculo fúngico como así también la concentración a utilizar.

Para cada aislamiento fúngico se utilizaron 80 ninfas del quinto estadio, dispuestos en grupos de 20 por réplica. Cada tratamiento consistió en 4 mudas (plantines) de yerba mate, siendo que en cada muda se transfirieron 20 ninfas del quinto estadio, con la ayuda de un pincel fino de pelo de marta humedecido. Fueron aplicados 2 ml de la suspensión de conidios utilizando un micropulverizador (aerógrafo) de marca Sagyma SW775 acoplado a un compresor de flujo continuo de aire, con compresión constante de 5 lb de salida, a una distancia de aproximadamente 20 cm, sobre las ninfas de *G. spegazziniana*, las cuales fueron posteriormente acondicionadas en jaulas de PVC cristal de 13 cm de diámetro x 40 cm de alto. Fueron realizadas cuatro réplicas y un control para cada tratamiento. Los tratamientos controles fueron tratados de manera similar, aplicándoles únicamente una solución de Tween 80 (0,01% v/v) esterilizado, libre de conidios. Los tratamientos fueron mantenidos bajo condiciones controladas ( $26 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 14 hs de luz) (Figura 12).



**Figura 12. Ensayo de patogenicidad contra *G. spegazziniana*.**

Se colocaron 20 ninfas del quinto estadio de *G. spegazziniana* por cada muda de yerba mate y se inoculó 2 ml de una suspensión fúngica ( $1 \times 10^9$  conidios/ml) o tween 80 0,01% (control). Los tratamientos fueron mantenidos en condiciones controladas ( $26 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 14 hs de luz) y diariamente se evaluó el porcentaje de mortalidad.

### **2.10.3. Tratamiento post inoculativo realizado en los ensayos de patogenicidad**

Los registros de mortalidad se realizaron cada 24 h hasta los 10 días posteriores a la inoculación. Los insectos muertos fueron retirados y esterilizados superficialmente en alcohol 70% y dos baños sucesivos en agua destilada estéril. Luego fueron colocados en cámaras húmedas, mantenidas en condiciones controladas ( $26 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 14 hs de luz), para la emersión del micelio del hongo. La confirmación de la mortalidad fue realizada mediante la visualización del insecto bajo el microscopio estereoscópico. Aquellos insectos que no presentaron visualización externa de micelio, fueron transferidos a cápsulas de Petri con medio agar avena (Anexo), mantenidas en condiciones controladas ( $26 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 14 hs de luz), para la exteriorización del micelio.

### **2.10.4. Análisis estadísticos**

La mortalidad de los controles fue corregida utilizando la Fórmula de Abbott (1925).

$$MC = \frac{(\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad control})}{(100 - \% \text{ mortalidad control})} \times 100$$

Los valores del porcentaje de mortalidad fueron transformados a arcoseno. Para determinar si las diferencias entre los distintos aislamientos fueron significativas se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con 95% de significancia, y luego un test de Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparar las medias entre pares de tratamientos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statgraphics Centurion 15.2 program (StatPoint, Inc. 2007).

Para cada tratamiento se calculo el porcentaje de mortalidad obtenido a los 10 días posteriores a la inoculación, como así también, se estimó el tiempo letal 50 ( $TL_{50}$ ) mediante el uso del programa Probit (Throne *et al.*, 1995).

## 2.11. Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por medio de técnicas moleculares

### 2.11.1. Preparación del material fúngico

Fueron seleccionados 17 aislamientos de *Beauveria bassiana*, correspondiendo 16 aislamientos a los obtenidos a partir de suelos de cultivos de yerba mate y 1 aislamiento de referencia de la colección del CEPAVE.

Para cada aislamiento fue obtenida una suspensión de aproximadamente  $1 \times 10^6$  conidios en 2,5 ml de "Tween 80". Fue inoculado 1 ml de esta suspensión en erlenmeyers conteniendo 250 ml de medio cultivo SDYA líquido estéril. Después de realizar el inóculo, el cultivo fue incubado con agitación de 180 rpm por 96 horas a 37 °C. Una vez transcurrido dicho período, cada cultivo líquido fue filtrado con ayuda de una bomba de vacío para coleccionar el micelio. Este micelio fue lavado con agua destilada estéril para retirar los restos del medio de cultivo y almacenado a - 20 °C hasta su utilización en la extracción del ADN (Ácido desoxirribonucleico).

### 2.11.2. Extracción del ADN genómico

Los ácidos nucleicos fueron extraídos según Azevedo *et al.* (2000). Un gramo del micelio obtenido por filtración en la etapa anterior fue triturado con el auxilio de nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. A este polvo micelial se le adicionó 800 µl de buffer de extracción ( 4 ml Tris- HCl 1 M pH 8,0; 1 ml EDTA 0,5 M pH 8,0; 2 ml SDS 10% p/v; 1 ml NaCl 5 M; 12 ml de agua destilada esterilizada). Después de homogenizar, el eppendorf fue colocado a 65 °C por 15 minutos. Posteriormente se adicionó 800 µl de fenol y se centrifugó a 12.000 rpm por 15 minutos. La fase acuosa fue transferida a un nuevo eppendorf e igual volumen de clorofane (fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, en la proporción 25:24:1, respectivamente) fue adicionado. Después de centrifugar a 12.000 rpm, durante 15 minutos, nuevamente la fase acuosa fue transferida para nuevos eppendorf (aproximadamente 400 µl en cada tubo), y 1/10 del volumen de NaCl 3 M fue adicionado (aproximadamente 40 µl). Después, se adicionó dos volúmenes de etanol absoluto enfriado a - 20 °C por una hora, para precipitar los ácidos nucleicos. Después, la muestra fue nuevamente sometida a centrifugación de

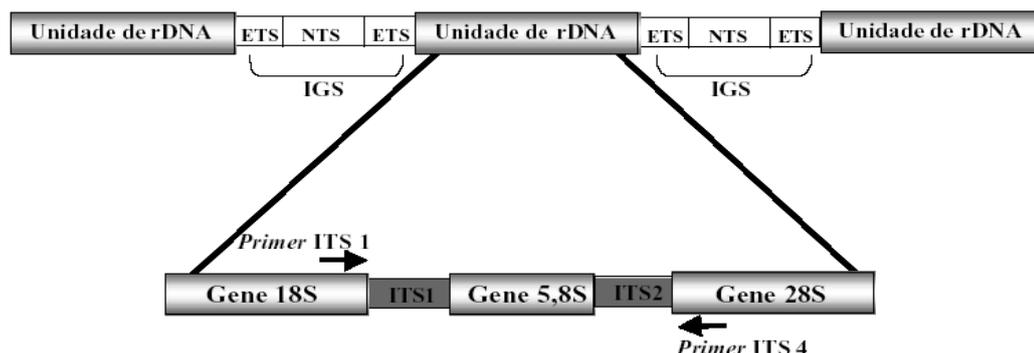
12.000 rpm durante 5 minutos, con posterior descarte del sobrenadante y lavado del pellet con etanol 70%, con subsecuente centrifugación a 12.000 rpm por 5 minutos. Nuevamente el sobrenadante fue descartado y el eppendorf fue mantenido a temperatura ambiente hasta completar el secado del ADN. El material precipitado fue posteriormente resuspendido en 50  $\mu$ l de buffer TE (1 ml Tris-HCl 1 M pH 8,0; 0,2 ml EDTA 0,5 M pH 8,0; 98,8 ml H<sub>2</sub>O) y mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.11.3. Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN fue realizada en un espectrofotómetro AmpliQuant AQ-07. Para la cuantificación de cada muestra fueron utilizados 10  $\mu$ l del ADN, y se realizaron dos lecturas. Después de la cuantificación las muestras fueron diluidas a fin de ajustar una concentración del ADN para 5 ng/ $\mu$ l.

### 2.11.4. Amplificación del ADNr por PCR

La reacción de amplificación de la región ITS1 – 5,8S – ITS2 de todos los aislamientos de *B. bassiana* fue efectuada utilizándose los primers específicos ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) (Figura 13) (Tabla 2).



**Figura 13. Organización de las unidades del ADN ribosomal en el genoma fúngico y de los sitios de reconocimiento de los primers universales ITS1 e ITS4.**

Para el análisis de las regiones ITS las reacciones de amplificación fueron preparadas en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ , conteniendo 5,0  $\mu\text{l}$  de buffer (Invitrogen Life Technologies 200 mM Tris- HCl pH 8,4, 500mM KCl, 10x concentrado); 4  $\mu\text{l}$  de dNTP (Invitrogen Life Technologies 2,5 mM); 3  $\mu\text{l}$  de primer ITS1 (Invitrogen Life Technologies 10 pmol/ $\mu\text{l}$ ); 3  $\mu\text{l}$  de primer ITS4 (Invitrogen Life Technologies 10 pmol/ $\mu\text{l}$ ); 2  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen Life Technologies 50 mM); 2  $\mu\text{l}$  de Taq DNA polimerasa (Invitrogen Life Technologies 5 U/ $\mu\text{l}$ ); 4  $\mu\text{l}$  de DNA (5 ng/ $\mu\text{l}$ ) y 27  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura.

La mezcla de la reacción fue sometida al termociclador “Mastercycler” (Eppendorf) previamente programado para 35 ciclos después de la desnaturalización inicial de 4 minutos a 92 °C. Cada ciclo de amplificación fue constituido de tres etapas: desnaturalización (95 °C, 2 min.), hibridación (64 °C, 30 seg.) y extensión (72 °C, 1 min.). Al final de los 35 ciclos fue realizada una extensión por 5 minutos a 72 °C. Después de la amplificación las muestras fueron analizadas a través de electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Los geles fueron coloreados con bromuro de etidio y fotografiados con fotodocumentador Digi Doc.

Los productos obtenidos de la reacción de PCR fueron purificados utilizando el kit comercial de purificación “Wizard® SV Gel and PCR Clean – Up System”. La purificación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN después de la purificación, fue realizada en un espectrofotómetro AmpliQuant AQ-07; para la cuantificación de cada muestra fueron utilizados 10  $\mu\text{l}$  del ADN, y se realizaron dos lecturas.

**Tabla 2. Secuencia de los *primers* utilizados en la amplificación de la región ITS1-DNAr 5,8S-ITS para *B. bassiana***

<i>Primers</i>	Secuencia
ITS 1	5' TTCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
ITS 4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Fuente: White *et al.* (1990)

### 2.11.5. Secuenciación y análisis filogenético

Las secuencias de las muestras fueron realizadas en la Unidad de Genómica – Instituto de Biotecnología – CICVyA – INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) utilizando secuenciadores de capilares, con protocolos optimizados de terminadores fluorescentes. La secuenciación fue realizada por el método de Sanger *et al.* (1977); los ADN – molde (30 a 45 ng) fueron marcados por PCR utilizando los *primers* ITS1 e ITS4 (Tabla 2). Las secuencias fueron realizadas en un volumen final de 10 µl, conteniendo 4,0 µl de ADN de la muestra (PCR específica); 2,0 µl de *primers* ITS1 e ITS4, y 4,0 µl del Kit “DYEnamic ET dye terminador Cycle Sequencing”. La reacción fue sometida a un termociclador “Mastercycler” (Eppendorf), previamente programado para 35 ciclos después de la desnaturalización inicial de 1 minuto a 95 °C. Cada ciclo de amplificación fue constituido de tres etapas: desnaturalización (95 °C, 20 seg.), hibridación (55 °C, 1min.) y extensión (60 °C, 1 min.).

Los alineamientos y análisis de las secuencias nucleotídicas fueron realizados con el programa Sequencher v 4.5 (Gene Codes Corp.), en la matriz se incluyeron secuencias de referencia para el género *Beauveria*.

Para la construcción del árbol filogenético, se utilizó el principio de máxima parsimonia implementado en el programa TNT versión 1.1 (Goloboff *et al.*, 2008). Los valores de bootstrap fueron obtenidos basados en 1000 réplicas.



*Resultados*

## RESULTADOS

### Prospección, aislamiento, caracterización e identificación de hongos patógenos en insectos plaga de la yerba mate

#### 3.1.1. Relevamiento de individuos de *H. betulinus* y *G. spegazziniana* y hongos entomopatógenos

La prospección de insectos y sus hongos entomopatógenos fue efectuada en cultivos de yerba mate, los muestreos fueron realizados con una frecuencia cada 15 días en el período comprendido entre mayo de 2008 y septiembre de 2010 (Tabla 3). En la mayoría de los sitios de muestreo se observó que *G. spegazziniana* “rulo o psilido de la yerba mate” (Hemiptera: Psyllidae) fue una de las plagas predominantes, junto con *H. betulinus* “taladro o tigre de la yerba mate” (Coleoptera: Cerambycidae). *Gyropozylla spegazziniana* se encontró en 13 sitios de muestreo (sitio 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15), mientras que *H. betulinus* se encontró en 4 áreas de muestreo (sitio 1, 2, 4 y 6) (Tabla 3). Otras plagas encontradas fueron *Perigonia lusca* “orugas rabudas o Marandová” (Lepidoptera: Sphingidae), *Ceroplastes grandis* “cochinillas cerosas” (Hemiptera: Coccidae), *Fidicina mannifera* “chicharras” (Hemiptera: Cicadellidae) y *Thelosia camina* “oruga de la yerba mate” (Lepidoptera: Eupterotidae).

#### 3.1.2. Prospección de hongos patógenos de *H. betulinus* y *G. spegazziniana*

Como resultado de dos años de relevamiento de individuos adultos y estados juveniles de *H. betulinus* y *G. spegazziniana* en la provincia de Misiones (Tabla 3), no se observó la presencia de infecciones fúngicas evidentes en campo, como tampoco luego del período de mantención en laboratorio, por lo que no se muestran los resultados del relevamiento. La ausencia de hongos entomopatógenos durante este relevamiento podría deberse a las condiciones ambientales durante este período de muestreo. En la zona sur de la provincia de Misiones (Sitio 1, 3, 7, 8, 12 y 14) durante los meses de muestreo en el año 2008 se registró un promedio de precipitaciones de

112,3 mm; humedad relativa de 68,2% y temperatura media de 20,4 °C; en el año 2009 se registró un promedio de precipitaciones de 159,5 mm; humedad relativa de 69,2% y temperatura media de 21,9 °C y en el año 2010 se registró un promedio de precipitaciones de 134,2 mm; humedad relativa de 71,7% y una temperatura media de 21,1 °C. En la zona centro de la provincia de Misiones (Sitio 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13 y 15) durante los meses de muestreo en el año 2008 se registró un promedio de precipitaciones de 120,8 mm; humedad relativa de 79,3% y temperatura media de 18,9 °C; en el año 2009 se registró un promedio de precipitaciones de 162,7 mm; humedad relativa de 83,4% y temperatura media de 20,4 °C y en el año 2010 se registró un promedio de precipitaciones de 142,5 mm; humedad relativa de 83,5% y una temperatura media de 19,7 °C (Figura 14).

Al comparar las dos zonas de muestreo (sur y centro de la provincia de Misiones) durante los dos años de muestreo no se observaron diferencias estadísticamente significativas para las variables temperatura media ( $t = 1,32$ ;  $p = 0,190$ ) y precipitaciones ( $t = 0,27$ ;  $p = 0,781$ ), a pesar de que en la zona sur la temperatura media fue de 21,3 °C y las precipitaciones de 138,8 mm, en cambio en la zona centro la temperatura media fue de 19,8 °C y las precipitaciones de 144,9 mm. Si se observaron diferencias altamente significativas en la variable humedad relativa ( $t = 13,45$ ;  $p = < 0,001$ ), siendo que en la zona sur la humedad relativa fue 69,8% y en la zona centro fue 82,3%.

### **3.1.3. Aislamiento monospórico e identificación de hongos entomopatógenos a partir de muestras de suelo**

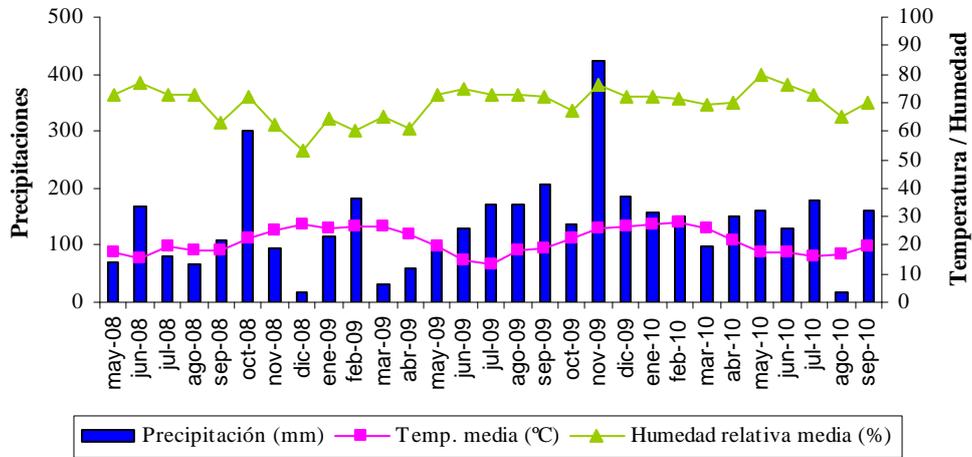
Se recolectaron 40 muestras de suelo de cultivos de yerba mate orgánico y convencional de los sitios 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 13 y 15. Como resultado de estos sucesivos muestreos pudieron aislarse en cultivo axénico 29 aislamientos (Tabla 4).

Los aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelo fueron identificados como: 17 cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. 1912; 2 cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 y 10 cepas de *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Hywel-Jones & Samsom 2011.

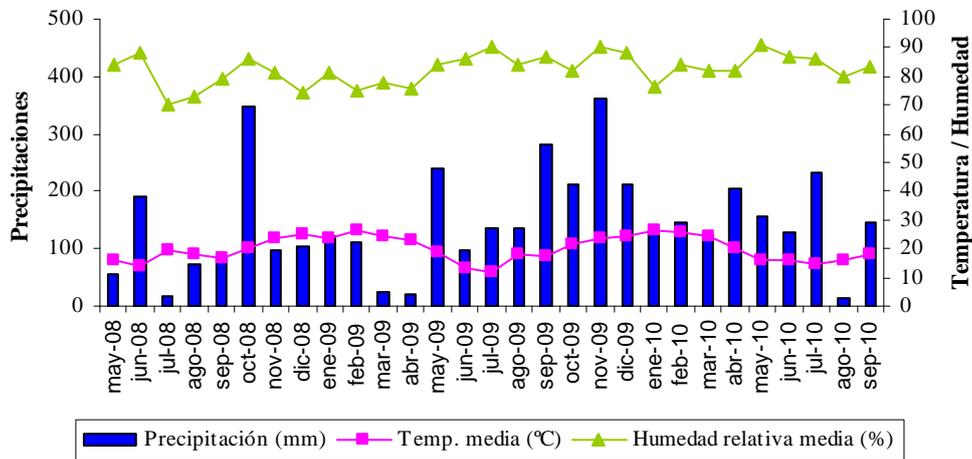
**Tabla 3. Recolección de *H. betulinus* y *G. spegazziniana* durante los años 2008 a 2010.**

Sitio de Muestreo	Ubicación	Insectos recolectados	Fecha del Muestreo
Sitio 1	Santa Inés Misiones	<i>G. spegazziniana</i> <i>H. betulinus</i>	2008-2009
Sitio 2	Jardín América Misiones	<i>G. spegazziniana</i> <i>H. betulinus</i>	2008-2009
Sitio 3	Candelaria Misiones	<i>G. spegazziniana</i>	2008-2009
Sitio 4	Colonia Aurora Misiones	<i>H. betulinus</i>	06/01/2009
Sitio 5	Oberá Misiones	<i>G. spegazziniana</i>	04/02/2009
Sitio 6	Santo Pipo Misiones	<i>H. betulinus</i>	15/02/2009
Sitio 7	Apóstoles Misiones	<i>G. spegazziniana</i>	25/06/2009
Sitio 8	Apóstoles Misiones	<i>G. spegazziniana</i>	30/06/2009
Sitio 9	Oberá Misiones	<i>G. spegazziniana</i>	20/12/2009
Sitio 10	Jardín América Misiones	<i>G. spegazziniana</i>	03/01/2010
Sitio 11	Leandro N. Alem Misiones	<i>G. spegazziniana</i>	17/01/2010
Sitio 12	Santa Inés Misiones	<i>G. spegazziniana</i>	04/02/2010
Sitio 13	Ruiz de Montoya Misiones	<i>G. spegazziniana</i>	09/03/2010
Sitio 14	Colonia Liebig Corrientes	<i>G. spegazziniana</i>	25/03/2010
Sitio 15	Campo Ramón Misiones	<i>G. spegazziniana</i>	14/05/2010

**ZONA SUR**



**ZONA CENTRO**



**Figura 14. Promedio de precipitaciones, temperatura media y humedad relativa durante los años 2008, 2009 y 2010.**

**Tabla 4. Descripción de los aislamientos fúngicos obtenidos de a partir de muestras de suelo provenientes de cultivos de yerba mate.**

<b>Especie fúngica</b>	<b>N° Colección CEPAVE</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Fecha Muestreo</b>
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 332	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	01/11/2008
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 333	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	01/11/2008
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 334	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	01/12/2008
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 335	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	01/12/2008
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 336	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	01/11/2008
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 337	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	17/02/2009
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 338	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	17/02/2009
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 339	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	17/02/2009
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 340	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	01/11/2008
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 341	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	17/02/2009
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 342	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	17/02/2009
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 343	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	01/12/2008
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 344	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	01/11/2008
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 345	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	01/11/2008
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 346	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	17/02/2009

<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 347	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones,	05/01/2009
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 348	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	05/01/2009
<i>Metarhizium anisopliae</i>	CEP 349	Suelo	Yerba Mate <sup>+</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	17/02/2009
<i>Metarhizium anisopliae</i>	CEP 350	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Campo Ramón (Sitio 15) Misiones	14/05/2010
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 351	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Jardin América (Sitio 2) Misiones	02/06/2009
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 352	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Apóstoles (Sitio 7) Misiones	25/06/2009
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 353	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Apóstoles (Sitio 8) Misiones	30/06/2009
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 354	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Apóstoles (Sitio 7) Misiones	25/06/2009
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 355	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Apóstoles (Sitio 8) Misiones	30/06/2009
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 356	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	17/02/2009
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 357	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Apóstoles (Sitio 8) Misiones	30/06/2009
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 358	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Santa Inés (Sitio 1) Misiones	05/03/2010
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 359	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Jardín América (Sitio 2) Misiones	04/07/2009
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 360	Suelo	Yerba Mate <sup>*</sup>	Ruiz de Montoya (Sitio 13) Misiones	09/03/2010

<sup>+</sup> Cultivos de yerba mate orgánicos

<sup>\*</sup> Cultivos de yerba mate convencionales

### 3.1.4. Caracterización morfológica de los hongos patógenos aislados de suelo de cultivos de yerba mate

En la tabla 4 se presentan los datos de las especies fúngicas obtenidas, así como sus números de acceso a la colección, el substrato del que fueron aislados, el sitio y fecha de muestreo de cada uno de ellos.

Todos los aislamientos fueron preservados en la colección de hongos entomopatógenos del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), La Plata, Argentina y en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidade Estadual do Estado do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil, bajo determinados números de acceso.

El hongo entomopatógeno *P. lilacinum* (Thom) fue denominado antiguamente por Samson (1974) como *Paecilomyces lilacinus*, sin embargo, estudios filogenéticos ubicaron a éste hongo entomopatógeno dentro del Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales, Familia Ophioclavicipitaceae (Luangsa-ard *et al.*, 2011).

Al analizar las características morfológicas de estos aislamientos, se observó que presentaban diferencias en la tasa de crecimiento, la coloración del micelio fúngico y en las dimensiones de las estructuras reproductivas.

A continuación se da una descripción más detallada de las especies fúngicas caracterizadas en este estudio:

#### **Beauveria bassiana** (Bals.) Vuill.

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Cordycipitaceae

Las colonias presentaron un crecimiento moderadamente rápido en medio de cultivo SDYA, alcanzando un diámetro promedio de  $27,84 \pm 4,01$  mm a los 10 días de incubación a  $25^{\circ}$  C en oscuridad; el diámetro de la colonia osciló entre  $17,2 \pm 0,95$  mm del aislamiento CEP 343 y  $32,6 \pm 0,89$  mm del aislamiento CEP 339 (Tabla 5).

Las diferencias en la tasa de crecimiento fueron altamente significativas entre los aislamientos fúngicos (ANOVA  $F = 14,90$ ;  $g.l = 16$ ;  $p < 0,0001$ ), observando el valor máximo en el aislamiento CEP 339 ( $3,26 \pm 0,08$  mm/día) y el valor mínimo en el aislamiento CEP 343 ( $1,72 \pm 0,09$  mm/día) (Tabla 5) (Figura 15).

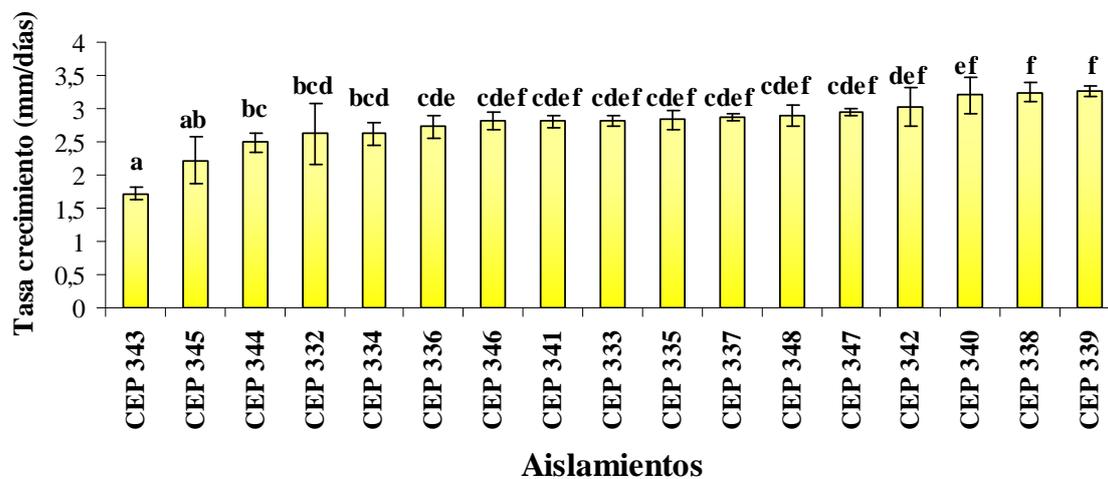
El micelio fúngico presentó un aspecto pulverulento de coloración blanco (Figura 16). El reverso del micelio fúngico mostró una pigmentación de color amarillo en todos los aislamientos. Se debe destacar que en el micelio de los aislamientos CEP 333, CEP 33, CEP 335, CEP 341, CEP 343 y CEP 344 se observó la presencia de gotas de exudado de color amarillo claro. El inicio de la esporulación se observó entre el séptimo y el décimo día de incubación a 25 °C en condiciones de oscuridad.

**Tabla 5. Descripción macroscópica de los aislamientos fúngicos de *B. bassiana*.**

N° Colección CEPAVE	Color de la colonia	Diámetro de la colonia (mm) <sup>+</sup>	Tasa de crecimiento (mm/día) <sup>*</sup>
CEP 332	blanco	26,2 (4,76)	2,62 (0,47) <b>bcd</b>
CEP 333	blanco	28,2 (0,83)	2,82 (0,08) <b>cdef</b>
CEP 334	blanco	26,2 (1,75)	2,62 (0,17) <b>bcd</b>
CEP 335	blanco	28,3 (1,44)	2,83 (0,14) <b>cdef</b>
CEP 336	blanco	27,3 (1,71)	2,73 (0,17) <b>cde</b>
CEP 337	blanco	28,6 (0,54)	2,86 (0,05) <b>cdef</b>
CEP 338	blanco	32,5 (1,58)	3,25 (0,15) <b>f</b>
CEP 339	blanco	32,6 (0,89)	3,26 (0,08) <b>f</b>
CEP 340	blanco	32,0 (2,82)	3,20 (0,28) <b>ef</b>
CEP 341	blanco	28,1 (1,38)	2,81 (0,09) <b>cdef</b>
CEP 342	blanco	30,3 (2,94)	3,03 (0,29) <b>def</b>
CEP 343	blanco	17,2 (0,95)	1,72 (0,09) <b>a</b>
CEP 344	blanco	24,9 (1,43)	2,49 (0,14) <b>bc</b>
CEP 345	blanco	22,2 (3,56)	2,22 (0,35) <b>ab</b>
CEP 346	blanco	28,1 (1,38)	2,81 (0,13) <b>cdef</b>
CEP 347	blanco	29,5 (0,61)	2,95 (0,06) <b>cdef</b>
CEP 348	blanco	29,0 (1,69)	2,90 (0,16) <b>cdef</b>

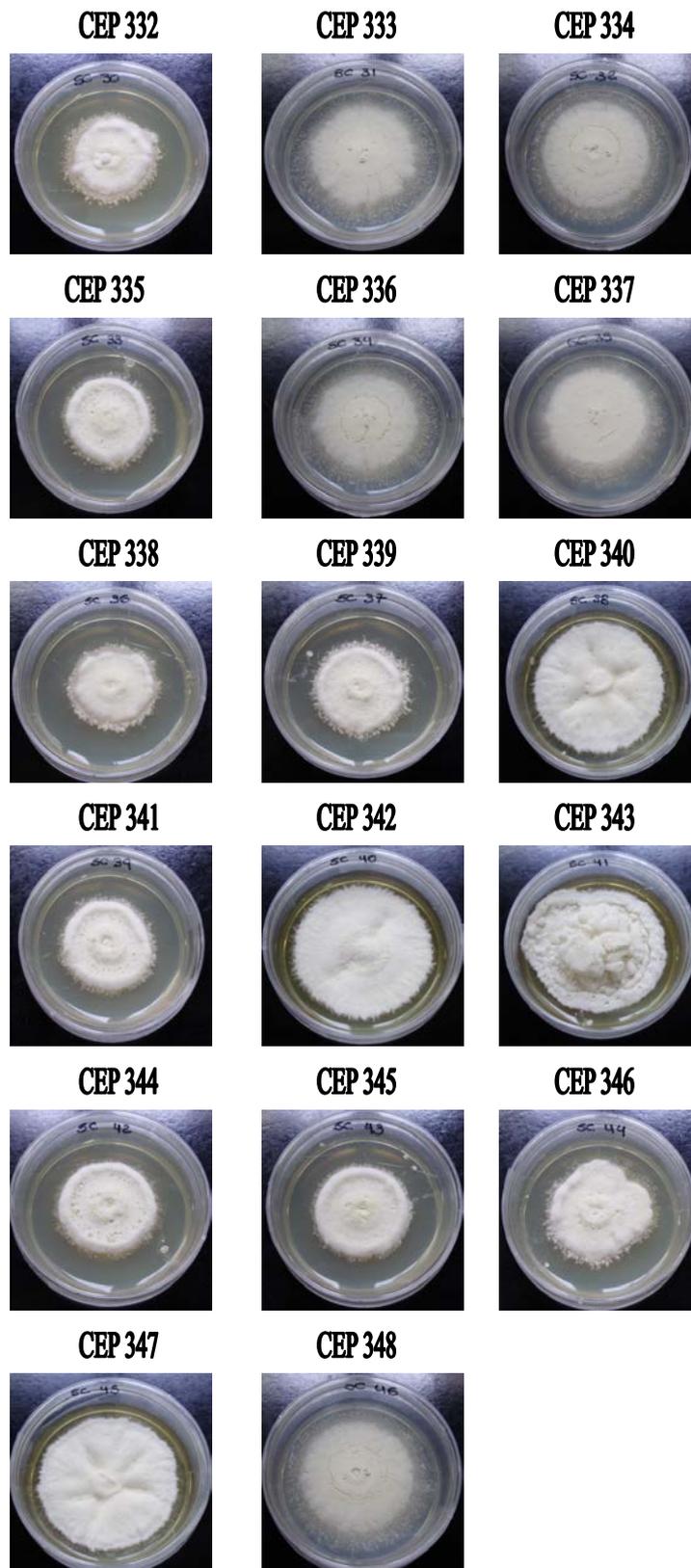
+ Diámetro promedio de la colonia (error estándar) determinado a los 10 días post-incubación a 25 °C en condiciones de oscuridad.

\* Tasa de crecimiento promedio (error estándar) determinado como el diámetro de colonia/el tiempo de incubación. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).



**Figura 15. Tasa de crecimiento de los aislamientos de *B. bassiana* alcanzado a los 10 días desde la inoculación.**

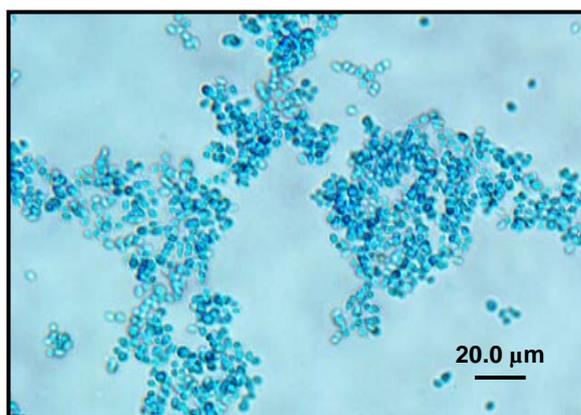
Las barras indican la tasa de crecimiento y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias altamente significativas obtenidas por el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16. Morfología de la colonia de los diferentes aislamientos de *B. bassiana*.**

Se sembraron cada uno de los aislamientos fúngicos en medio de cultivo SDYA y se incubaron a 25 °C en condiciones de oscuridad durante 15 días.

Los conidióforos se mostraron agrupados en racimos, con fiálides con parte basal dilatada terminando en un raquis en zig-zag, los conidios presentaron una forma globosa a subglobosa (Figura 17). Las diferencias en el largo de los conidios entre los diferentes aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (ANOVA  $F = 6,10$ ;  $g.l = 16$ ;  $p < 0,0001$ ), observando el valor máximo en CEP 344 ( $2,98 \pm 0,35 \mu\text{m}$ ) y el valor mínimo en CEP 343 ( $2,28 \pm 0,19 \mu\text{m}$ ); el tamaño promedio de los conidios fue de  $2,81 \pm 0,33 \mu\text{m}$ . Las diferencias en el ancho de los conidios entre los diferentes aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (ANOVA  $F = 3,81$ ;  $g.l = 16$ ;  $p < 0,0001$ ), observando el valor máximo en CEP 342 ( $2,45 \pm 0,36 \mu\text{m}$ ) y el valor mínimo en CEP 343 ( $2,04 \pm 0,23 \mu\text{m}$ ); el tamaño promedio de los conidios fue de  $2,30 \pm 0,28 \mu\text{m}$  (Tabla 6).



**Figura 17. Observación microscópica de los conidios de *B. bassiana*.**

A partir de cultivos *in vitro* de *B. bassiana*, se realizaron preparados microscópicos con el colorante azul de algodón-lactofenol de Ammann (0,01 p/v).

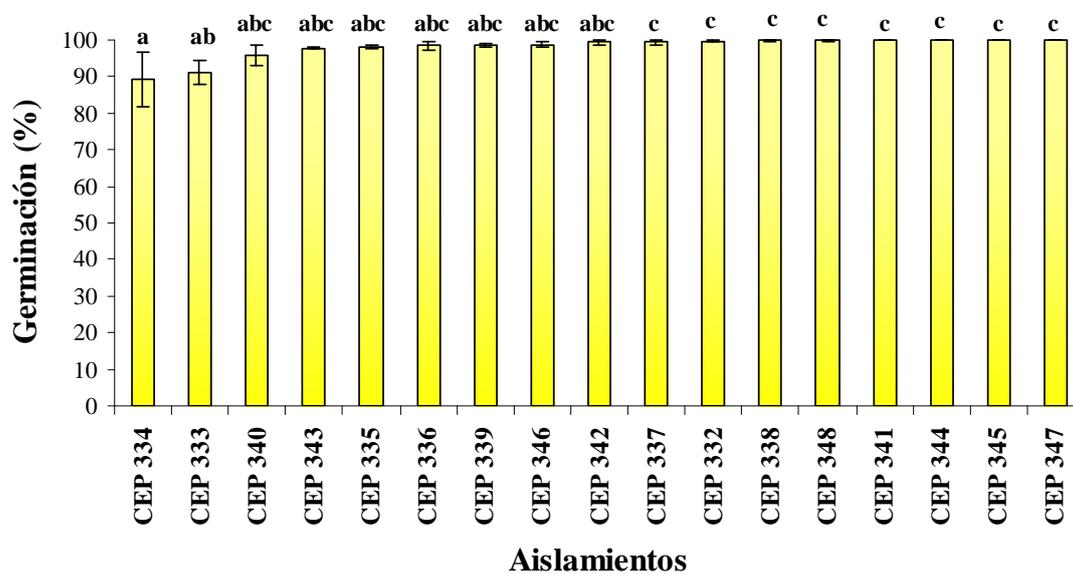
La viabilidad de los conidios fue medida como porcentaje de germinación. Las diferencias entre los aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (ANOVA  $F = 4,66$ ;  $g.l = 16$ ;  $p = 0,0001$ ), obteniendo valores superiores al 90%, excepto el aislamiento CEP 334 que fue del 89,40% (Tabla 6) (Figura 18).

**Tabla 6. Descripción microscópica de los aislamientos fúngicos de *B. bassiana*.**

N° Colección CEPAVE	CONIDIOS			
	Forma	Tamaño ( $\mu\text{m}$ ) <sup>+</sup>		Germinación (%) <sup>*</sup>
		Largo	Ancho	
CEP 332	globosos-subglobosos	2,83 (0,31) <b>bc</b>	2,35 (0,20) <b>b</b>	99,60 (0,29) <b>c</b>
CEP 333	globosos-subglobosos	2,86 (0,30) <b>bc</b>	2,41 (0,24) <b>b</b>	91,93 (3,24) <b>ab</b>
CEP 334	globosos-subglobosos	2,80 (0,22) <b>bc</b>	2,30 (0,22) <b>ab</b>	89,46 (7,48) <b>a</b>
CEP 335	globosos-subglobosos	2,82 (0,24) <b>bc</b>	2,24 (0,23) <b>ab</b>	98,15 (0,55) <b>abc</b>
CEP 336	globosos-subglobosos	2,82 (0,24) <b>bc</b>	2,32 (0,28) <b>b</b>	98,43 (1,22) <b>abc</b>
CEP 337	globosos-subglobosos	2,93 (0,29) <b>bc</b>	2,31 (0,25) <b>b</b>	99,43 (0,66) <b>c</b>
CEP 338	globosos-subglobosos	2,83 (0,24) <b>bc</b>	2,29 (0,22) <b>ab</b>	99,83 (0,12) <b>c</b>
CEP 339	globosos-subglobosos	2,83 (0,23) <b>bc</b>	2,29 (0,23) <b>ab</b>	98,60 (0,49) <b>abc</b>
CEP 340	globosos-subglobosos	2,89 (0,37) <b>bc</b>	2,37 (0,26) <b>b</b>	95,83 (2,94) <b>abc</b>
CEP 341	globosos-subglobosos	2,85 (0,36) <b>bc</b>	2,33 (0,28) <b>b</b>	100 (0,00) <b>c</b>
CEP 342	globosos-subglobosos	2,87 (0,34) <b>bc</b>	2,45 (0,36) <b>b</b>	99,33 (0,74) <b>bc</b>
CEP 343	globosos-subglobosos	2,28 (0,19) <b>a</b>	2,04 (0,23) <b>a</b>	97,80 (0,14) <b>abc</b>
CEP 344	globosos-subglobosos	2,98 (0,35) <b>c</b>	2,43 (0,30) <b>b</b>	100 (0,00) <b>c</b>
CEP 345	globosos-subglobosos	2,63 (0,42) <b>b</b>	2,20 (0,34) <b>ab</b>	100 (0,00) <b>c</b>
CEP 346	globosos-subglobosos	2,88 (0,36) <b>bc</b>	2,42 (0,27) <b>b</b>	98,83 (0,84) <b>abc</b>
CEP 347	globosos-subglobosos	2,78 (0,29) <b>bc</b>	2,19 (0,28) <b>ab</b>	100 (0,00) <b>c</b>
CEP 348	globosos-subglobosos	2,82 (0,31) <b>bc</b>	2,22 (0,23) <b>ab</b>	99,83 (0,23) <b>c</b>

+ Mediciones del largo y ancho de los conidios (error estándar) realizadas bajo microscopio con contraste de fase. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

\*Porcentaje de germinación (error estándar) determinado a las 24hs post-inoculación. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).



**Figura 18. Porcentaje de germinación de conidios de *B. bassiana* a las 24 hs post-inoculación.**

Las barras indican el porcentaje de germinación y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias altamente significativas obtenidas por el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Metarhizium anisopliae** (Metsch.) Sorok**Phylum:** Ascomycota**Clase:** Sordariomycetes**Orden:** Hypocreales**Familia:** Clavicipitaceae

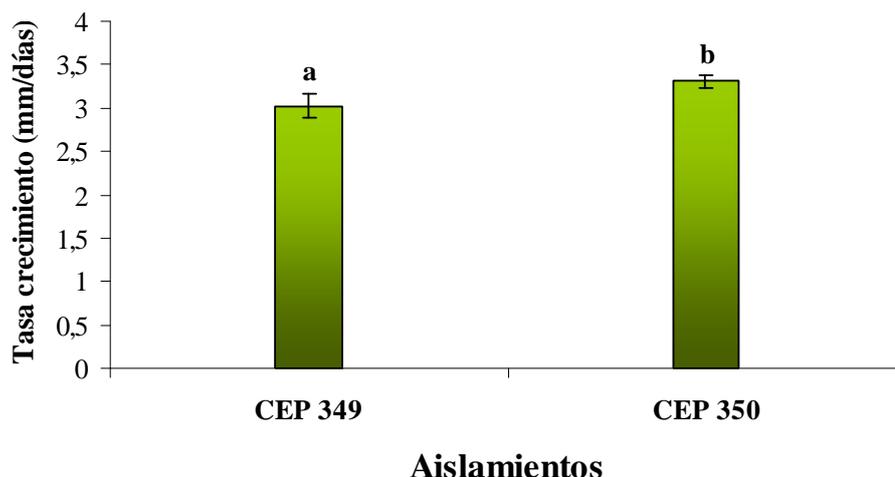
Las colonias presentaron un crecimiento moderadamente rápido en medio de cultivo SDYA, alcanzando un diámetro promedio de  $31,65 \pm 1,91$  mm a los 10 días de incubación a 25 °C en oscuridad; el diámetro de la colonia osciló entre  $30,2 \pm 1,48$  mm del aislamiento CEP 349 y  $33,1 \pm 0,89$  mm del aislamiento CEP 350 (Tabla 7). Las diferencias en la tasa de crecimiento fueron altamente significativas entre los dos aislamientos fúngicos (Student t = -3,74; g.l = 1; p = 0,0057), observando el valor máximo en el aislamiento CEP 350 ( $3,31 \pm 0,08$  mm/día) y el valor mínimo en el aislamiento CEP 349 ( $3,02 \pm 0,14$  mm/día) (Tabla 7) (Figura 19).

**Tabla 7. Descripción macroscópica de de los aislamientos fúngicos de *M. anisopliae***

N° Colección CEPAVE	Color de la colonia	Diámetro de la colonia (mm) <sup>+</sup>	Tasa de crecimiento (mm/día) <sup>*</sup>
CEP 349	verde oliváceo	30,2 (1,48)	3,02 (0,14) <b>a</b>
CEP 350	verde oliváceo	33,1 (0,8)	3,31 (0,08) <b>b</b>

+ Diámetro promedio de la colonia (error estándar) determinado a los 10 días post-incubación a 25 °C en condiciones de oscuridad.

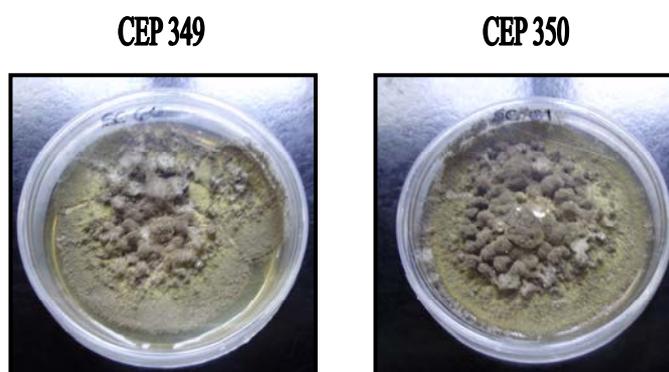
\* Tasa de crecimiento promedio (error estándar) determinado como el diámetro de colonia/el tiempo de incubación.



**Figura 19. Tasa de crecimiento de los aislamientos de *M. anisopliae* alcanzado a los 10 días desde la inoculación.**

Las barras indican la tasa de crecimiento y el error estándar.

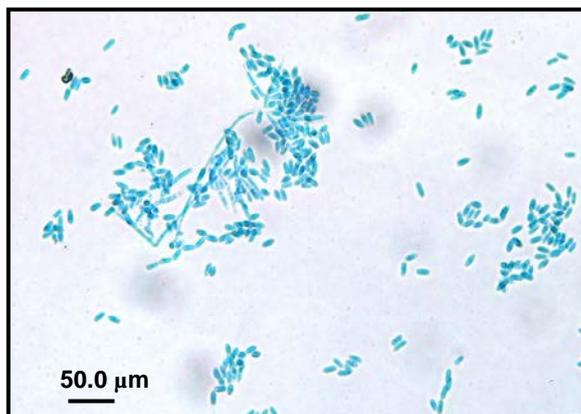
El micelio fúngico presentó un aspecto fino y abundante, elevado del medio de cultivo formando agrupaciones casi esféricas sobre las cuales se observa la esporulación de color verde oliváceo oscuro. Se debe destacar que en el micelio del aislamiento CEP 350 se observó la presencia de gotas de exudado de color incoloro (Figura 20). El reverso del micelio fúngico mostró una pigmentación de color amarillo pálido en los márgenes y amarillo más oscuro en el centro de los dos aislamientos. El inicio de la esporulación se observó entre el octavo y el décimo día de incubación a 25 °C en condiciones de oscuridad.



**Figura 20. Morfología de la colonia de los diferentes aislamientos de *M. anisopliae*.**

Se sembraron cada uno de los aislamientos fúngicos en medio de cultivo SDYA y se incubaron a 25 °C en condiciones de oscuridad durante 15 días.

El hongo presentó hifas lisas, septadas, los conidios presentaron una forma cilíndrica, ahusados y con ambos extremos redondeados, hialinos a oliváceos o verdes (Figura 21).



**Figura 21. Observación microscópica de los conidios de *M. anisopliae*.**

A partir de cultivos *in vitro* de *M. anisopliae*, se realizaron preparados microscópicos con el colorante azul de algodón-lactofenol de Ammann (0,01 p/v).

Las diferencias en el largo de los conidios entre los dos aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (Student  $t = -5,90$ ;  $g.l = 1$ ;  $p = 3,50E-7$ ), observando el valor máximo en CEP 350 ( $5,34 \pm 0,51 \mu\text{m}$ ) y el valor mínimo en CEP 349 ( $4,53 \pm 0,46 \mu\text{m}$ ); el tamaño promedio de los conidios fue de  $4,93 \pm 0,63 \mu\text{m}$ . Las diferencias en el ancho de los conidios entre los dos aislamientos fúngicos no fueron significativas (Student  $t = -1,15$ ;  $g.l = 1$ ;  $p = 0,2559$ ), el tamaño promedio de los conidios fue de  $2,65 \pm 0,32 \mu\text{m}$  (Tabla 8).

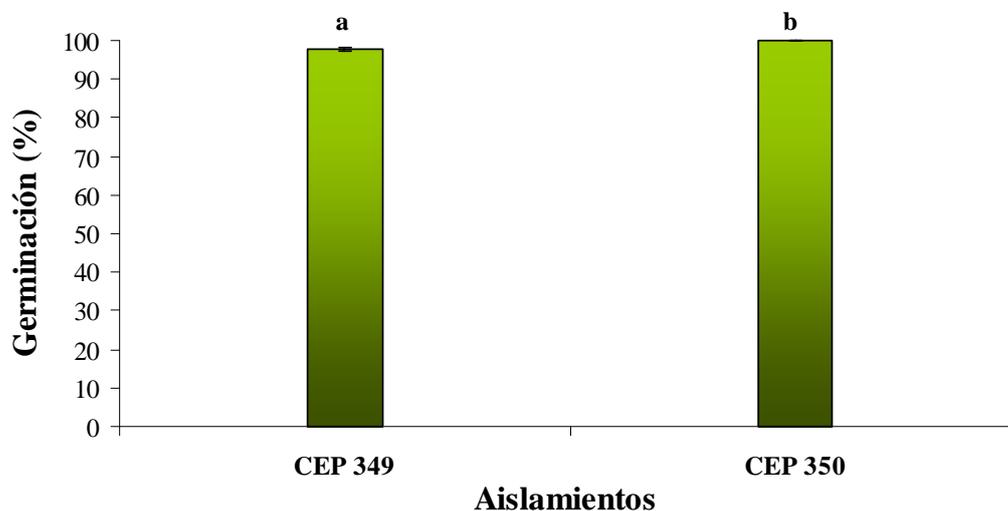
La viabilidad de los conidios fue medida como porcentaje de germinación. Las diferencias entre los aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (Student  $t = -5,81$ ;  $g.l = 1$ ;  $p = 0,0044$ ), obteniendo valores superiores al 90% (Tabla 8) (Figura 22).

**Tabla 8. Descripción microscópica de los aislamientos fúngicos de *M. anisopliae*.**

N° Colección CEPAVE	CONIDIOS			
	Forma	Tamaño (µm) <sup>+</sup>		Germinación (%) <sup>*</sup>
		Largo	Ancho	
CEP 349	cilíndrico	4,53 (0,46) <b>a</b>	2,60 (0,21)	97,80 (0,53) <b>a</b>
CEP 350	cilíndrico	5,34 (0,51) <b>b</b>	2,70 (0,41)	100 (0,00) <b>b</b>

+ Mediciones del largo y ancho de los conidios (error estándar) realizadas bajo microscopio con contraste de fase.

\*Porcentaje de germinación (error estándar) determinado a las 24 hs post-inoculación.



**Figura 22. Porcentaje de germinación de conidios de *M. anisopliae* a las 24 hs post-inoculación.**

Las barras indican el porcentaje de germinación y el error estándar.

***Purpureocillium lilacinum*** (Thom) Luangsa-ard, Hywel-Jones & Samsom**Phylum:** Ascomycota**Clase:** Sordariomycetes**Orden:** Hypocreales**Familia:** Ophiocordycipitaceae

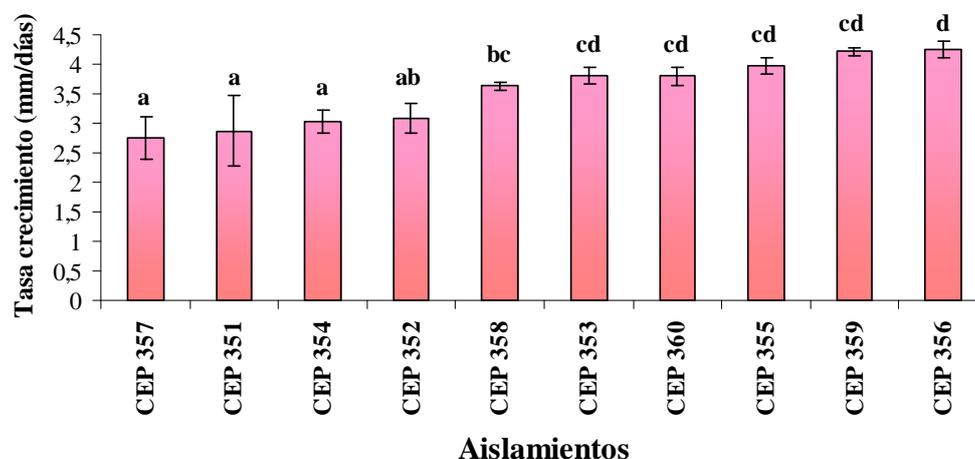
Las colonias presentaron un crecimiento moderadamente rápido en medio de cultivo SDYA, alcanzando un diámetro promedio de  $35,57 \pm 5,86$  mm a los 10 días de incubación a 25 °C en oscuridad; el diámetro de la colonia osciló entre  $27,62 \pm 3,63$  mm del aislamiento CEP 357 y  $42,50 \pm 1,41$  mm del aislamiento CEP 356 (Tabla 9). Las diferencias en la tasa de crecimiento entre los aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (ANOVA  $F = 21,80$ ;  $g.l = 9$ ;  $p < 0,0001$ ), observando el valor máximo en el aislamiento CEP 356 ( $4,25 \pm 0,14$  mm/día) y el valor mínimo en el aislamiento CEP 357 ( $2,76 \pm 0,36$  mm/día) (Tabla 9) (Figura 23).

**Tabla 9. Descripción macroscópica de de los aislamientos fúngicos de *P. lilacinum*.**

N° Colección CEPAVE	Color de la colonia	Diámetro de la colonia (mm) <sup>+</sup>	Tasa de crecimiento (mm/día) <sup>*</sup>
CEP 351	rosáceo	28,7 (5,99)	2,87 (0,59) <b>a</b>
CEP 352	rosáceo	30,8 (2,46)	3,08 (0,24) <b>ab</b>
CEP 353	rosáceo	38,0 (1,41)	3,80 (0,14) <b>cd</b>
CEP 354	rosáceo	30,3 (1,98)	3,03 (0,19) <b>a</b>
CEP 355	rosáceo	39,8 (1,48)	3,98 (0,14) <b>cd</b>
CEP 356	rosáceo	42,5 (1,41)	4,25 (0,14) <b>d</b>
CEP 357	rosáceo	27,6 (3,63)	2,76 (0,36) <b>a</b>
CEP 358	rosáceo	36,3 (0,75)	3,63 (0,07) <b>bc</b>
CEP 359	rosáceo	42,2 (0,75)	4,22 (0,07) <b>cd</b>
CEP 360	rosáceo	38,0 (5,86)	3,80 (0,58) <b>cd</b>

+ Diámetro promedio de la colonia (error estándar) determinado a los 10 días post-incubación a 25 °C en condiciones de oscuridad.

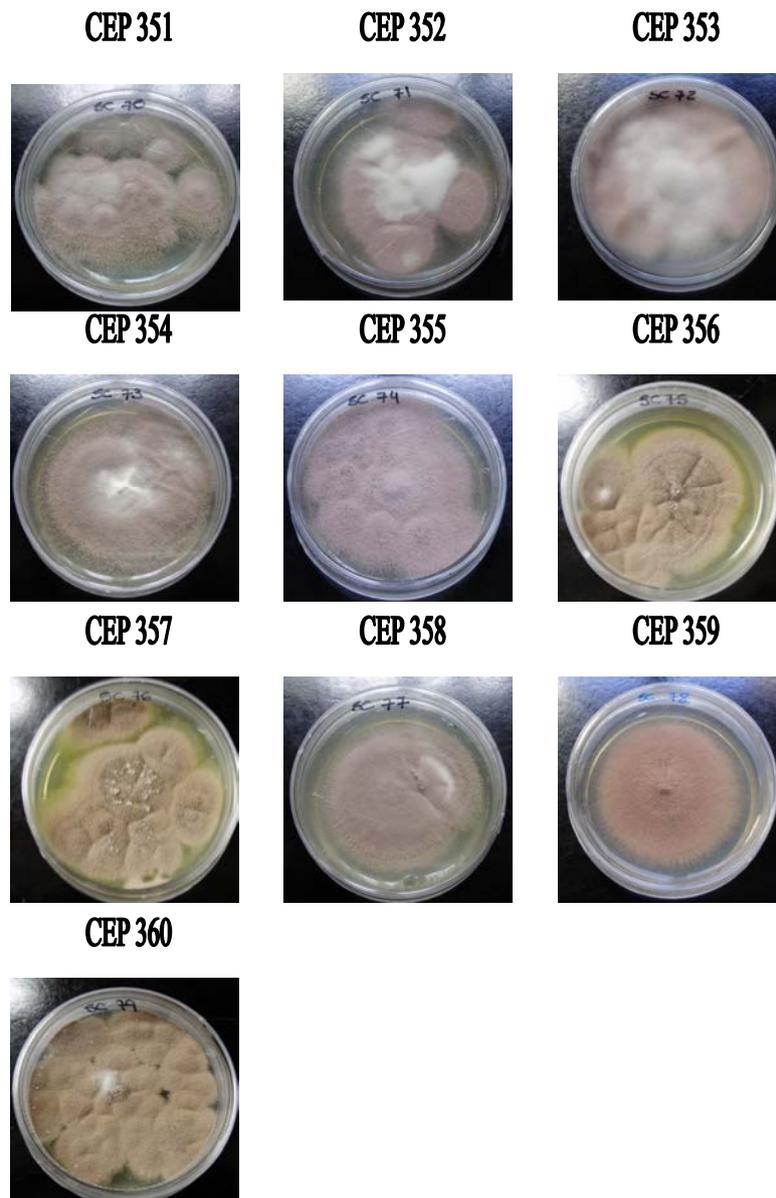
\* Tasa de crecimiento promedio (error estándar) determinado como el diámetro de colonia/el tiempo de incubación. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).



**Figura 23. Tasa de crecimiento de los aislamientos de *P. lilacinum* alcanzado a los 10 días desde la inoculación.**

Las barras indican la tasa de crecimiento y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias altamente significativas obtenidas por el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

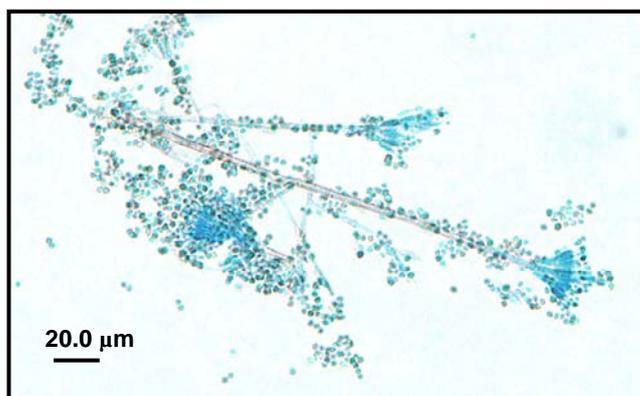
El micelio fúngico mostró un aspecto algodonoso y pulverulento, de color blanco al comienzo y tornándose con el correr de los días rosáceo. Se debe destacar que en el micelio del aislamiento CEP 357 se observó la presencia de gotas de exudado de color incoloro (Figura 24). El reverso del micelio fúngico mostró una pigmentación de color amarillo en todos los aislamientos. El inicio de la esporulación se observó entre el séptimo y el décimo día de incubación a 25 °C en condiciones de oscuridad.



**Figura 24. Morfología de la colonia de los diferentes aislamientos de *P. lilacinum*.**

Se sembraron cada uno de los aislamientos fúngicos en medio de cultivo SDYA y se incubaron a 25 °C en condiciones de oscuridad durante 15 días.

Las hifas vegetativas presentaron paredes hialinas y lisas. Los conidioforos fueron ramificados e irregulares, con fiálides que se caracterizan por constar de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. Los conidios presentaron una forma ovoide (Figura 25).



**Figura 25. Observación microscópica de los conidios, fiálides y conidióforos de *P. lilacinum*.**

A partir de cultivos *in vitro* de *P. lilacinum*, se realizaron preparados microscópicos con el colorante azul de algodón-lactofenol de Ammann (0,01 p/v).

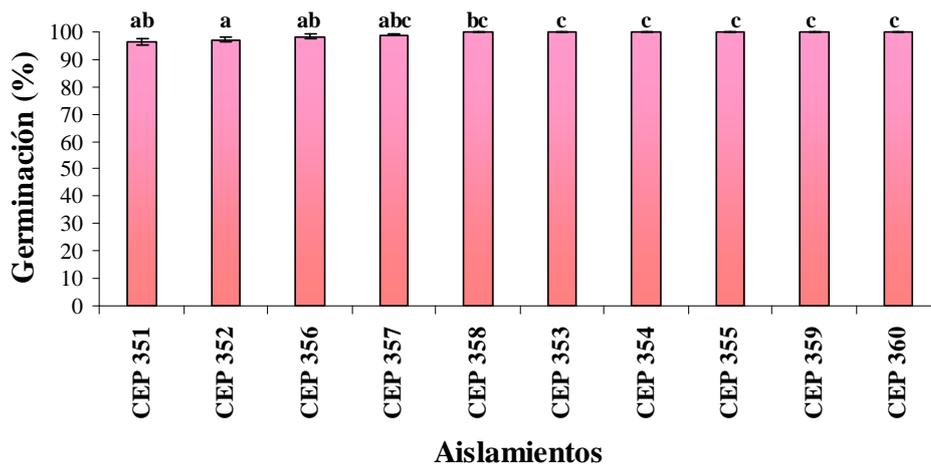
Las diferencias en el largo de los conidios entre los diferentes aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (ANOVA  $F = 6,36$ ; g.l = 9;  $p < 0,0001$ ), observando el valor máximo en CEP 352 ( $3,06 \pm 0,22 \mu\text{m}$ ) y el valor mínimo en CEP 359 ( $2,51 \pm 0,38 \mu\text{m}$ ); el tamaño promedio de los conidios fue de  $2,70 \pm 0,34 \mu\text{m}$ . Las diferencias en el ancho de los conidios entre los diferentes aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (ANOVA  $F = 5,88$ ; g.l = 9;  $p < 0,0001$ ), observando el valor máximo en CEP 352 ( $2,58 \pm 0,26 \mu\text{m}$ ) y el valor mínimo en el aislamiento CEP 360 ( $2,15 \pm 0,22 \mu\text{m}$ ); el tamaño promedio de los conidios fue de  $2,65 \pm 0,32 \mu\text{m}$  (Tabla 10). La viabilidad de los conidios fue medida como porcentaje de germinación. Las diferencias entre los aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (ANOVA  $F = 7,52$ ; g.l = 9;  $p = 0,0001$ ), obteniendo valores superiores al 90 %, (Tabla 10) (Figura 26).

**Tabla 10. Descripción microscópica de los aislamientos fúngicos de *P. lilacinum*.**

N° Colección CEPAVE	CONIDIOS			
	Forma	Tamaño ( $\mu\text{m}$ ) <sup>+</sup>		Germinación (%) <sup>*</sup>
		Largo	Ancho	
CEP 351	ovoide	2,79 (0,24) <b>ab</b>	2,33 (0,27) <b>a</b>	96,40 (1,10) <b>ab</b>
CEP 352	ovoide	3,06 (0,22) <b>b</b>	2,58 (0,26) <b>b</b>	97,33(0,74) <b>a</b>
CEP 353	ovoide	2,72 (0,33) <b>ab</b>	2,25 (0,20) <b>a</b>	100 (0,00) <b>c</b>
CEP 354	ovoide	2,66 (0,37) <b>ab</b>	2,27 (0,34) <b>a</b>	100 (0,00) <b>c</b>
CEP 355	ovoide	2,55 (0,29) <b>ab</b>	2,17 (0,19) <b>a</b>	100 (0,00) <b>c</b>
CEP 356	ovoide	2,55 (0,29) <b>ab</b>	2,22 (0,25) <b>a</b>	98,40 (0,86) <b>ab</b>
CEP 357	ovoide	2,71 (0,38) <b>ab</b>	2,18 (0,27) <b>a</b>	99,06 (0,44) <b>abc</b>
CEP 358	ovoide	2,73 (0,30) <b>ab</b>	2,30 (0,25) <b>a</b>	99,90 (0,14) <b>bc</b>
CEP 359	ovoide	2,51 (0,38) <b>a</b>	2,21 (0,26) <b>a</b>	100 (0,00) <b>c</b>
CEP 360	ovoide	2,71 (0,28) <b>ab</b>	2,15 (0,22) <b>a</b>	100 (0,00) <b>c</b>

+ Mediciones del largo y ancho de los conidios (error estándar) realizadas bajo microscopio con contraste de fase. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

\*Porcentaje de germinación (error estándar) determinado a las 24 hs post-inoculación. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).



**Figura 26. Porcentaje de germinación de conidios de *P. lilacinum* a las 24 hs post-inoculación.**

Las barras indican el porcentaje de germinación y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias altamente significativas obtenidas por el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos sobre individuos de *H. betulinus* “Taladro de la yerba mate”

### 3.2.1. Selección de los aislamientos fúngicos para las pruebas de patogenicidad de hongos Hypocreales contra *H. betulinus*

Se evaluó la patogenicidad de 24 aislamientos de hongos entomopatógenos Hypocreales sobre adultos de *H. betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae) en condiciones de laboratorio, siendo 15 aislamientos de *B. bassiana*, 2 aislamientos de *M. anisopliae* y 7 aislamientos de *P. lilacinum* (Tabla 11).

**Tabla 11. Características de los aislamientos de hongos Hypocreales utilizados en las pruebas de patogenicidad contra *H. betulinus*.**

Especie fúngica	N° Colección CEPAVE	Viabilidad conidios
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 332	99,60 % (0,29)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 333	91,93 % (3,24)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 334	89,46 % (7,48)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 335	98,15 % (0,55)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 336	98,43 % (1,22)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 337	99,43 % (0,66)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 338	99,83 % (0,12)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 339	98,60 % (0,49)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 340	95,83 % (2,94)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 341	100 % (0,00)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 342	99,33 % (0,74)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 343	97,80 % (0,14)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 344	100 % (0,00)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 345	100 % (0,00)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 347	100 % (0,00)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	CEP 349	97,80 % (0,53)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	CEP 350	100 % (0,00)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 352	97,33 % (0,74)

---

<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 353	100 % (0,00)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 354	100 % (0,00)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 355	100 % (0,00)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 356	98,40 % (0,86)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 359	100 % (0,00)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 360	100 % (0,00)

---

### 3.2.2. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos seleccionados

Los 15 aislamientos fúngicos de *B. bassiana* ocasionaron la infección y muerte de los adultos de *H. betulinus*. Los síntomas de infección fueron observados por la exteriorización del hongo, primeramente, en las zonas intersegmentales del abdomen, aparato bucal, antenas y patas, produciendo conidios de coloración blanca (Figura 27).



**Figura 27. Adultos de *H. betulinus* infectados con *B. bassiana*.**

Los adultos de *H. betulinus* fueron tratados con una suspensión fúngica de  $1 \times 10^8$  conidios/ml y al cabo de 7 días se observó el desarrollo de micelio blanco que cubrió todo el cuerpo del insecto en cámara húmeda.

Las diferencias en el porcentaje de mortalidad de los adultos de *H. betulinus* entre el tratamiento control y los 15 aislamientos fúngicos, fueron altamente significativas (ANOVA  $F = 6,42$ ;  $g.l = 15$ ;  $p < 0,0001$ ). Todos los aislamientos de *B. bassiana* ocasionaron un porcentaje de mortalidad superior al 50%, observando el valor máximo en CEP 334 y CEP 335 (86,67%) y el valor mínimo en CEP 347 (53,33%) (Tabla 12) (Figura 28).

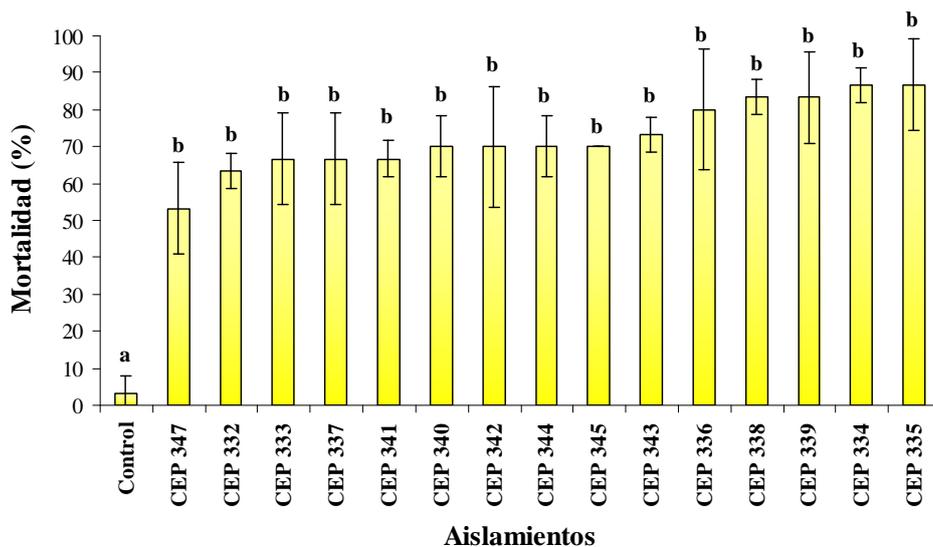
Se estimó el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) de los 15 aislamientos fúngicos infectando los adultos de *H. betulinus*. Los valores del TL<sub>50</sub> oscilaron entre 8,74 días para el aislamiento CEP 340 y 13,59 días para el aislamiento CEP 345 (Tabla 12) (Figura 29).

**Tabla 12. Determinación del porcentaje de mortalidad promedio y el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) de los aislamientos de *B. bassiana* contra adultos de *H. betulinus*.**

Aislamiento fúngico	Mortalidad (%) <sup>*</sup>	TL <sub>50</sub> (Días, IC 95 %) <sup>+</sup>
Control	3,33 (4,71) a	-
CEP 332	63,33 (4,71) b	11,76 (8,63-16,95)
CEP 333	66,66 (12,47) b	12,99 (7,82-40,35)
CEP 334	86,66 (4,71) b	11,64 (10,23-13,39)
CEP 335	86,66 (12,47) b	10,39 (9,29-11,64)
CEP 336	80,00 (16,32) b	10,19 (8,55-12,23)
CEP 337	66,66 (12,47) b	12,11 (9,65-15,97)
CEP 338	83,33 (4,71) b	9,64 (7,76-12,09)
CEP 339	83,33 (12,47) b	9,70 (7,79-12,10)
CEP 340	70,00 (8,16) b	8,74 (6,52-11,89)
CEP 341	66,66 (4,92) b	9,58 (8,05-11,29)
CEP 342	70,00 (16,32) b	10,29 (7,83-14,03)
CEP 343	73,33 (4,71) b	11,90 (10,47-13,73)
CEP 344	70,00 (8,16) b	11,90 (10,29-14,08)
CEP 345	70,00 (0,00) b	13,59 (12,01-15,88)
CEP 347	53,33 (12,47) b	12,17 (10,34-14,66)

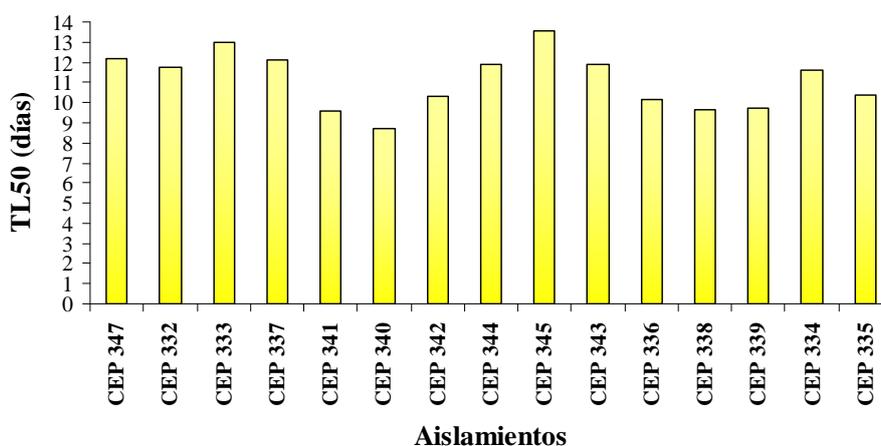
\* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) a los 15 días posteriores a la inoculación. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

+ Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) calculado con un programa Probit.



**Figura 28. Porcentaje de mortalidad confirmada de adultos de *H. betulinus* infectados con *B. bassiana*.**

Adultos de *H. betulinus* fueron tratados con una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/ml de *B. bassiana* e incubados durante 15 días bajo condiciones controladas ( $26 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 14 hs de luz). Diariamente, se cuantificó el número de adultos con desarrollo de micelio externo y se estimó el porcentaje de mortalidad promedio a los 15 días posteriores a la inoculación. Las barras indican el porcentaje de mortalidad confirmada y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias altamente significativas obtenidas por el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 29. Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>), en el estudio de la patogenicidad de aislamientos de *B. bassiana* contra adultos de *H. betulinus*.**

Los 2 aislamientos fúngicos de *M. anisopliae* ocasionaron la infección y muerte de los adultos de *H. betulinus*, el micelio emergió primeramente en las zonas intersegmentales del abdomen, aparato bucal, antenas y patas. Transcurridos siete días se observó sobre todo el cuerpo del hospedador, adoptando un aspecto esporulado de color verde oliva (Figura 30).



**Figura 30. Adultos de *H. betulinus* infectados con *M. anisopliae*.**

Los adultos de *H. betulinus* fueron tratados con una suspensión fúngica de  $1 \times 10^8$  conidios/ml y al cabo de 7 días se observó el desarrollo de micelio verde oliva que cubrió todo el cuerpo del insecto en cámara húmeda.

Las diferencias en el porcentaje de mortalidad de los adultos de *H. betulinus* entre el tratamiento control y los 2 aislamientos fúngicos, fueron altamente significativas (ANOVA  $F = 15,57$ ;  $g.l = 2$ ;  $p = 0,0042$ ). Los aislamientos de *M. anisopliae* ocasionaron un porcentaje de mortalidad superior al 70%, observando el valor máximo en CEP 350 (83,33%) y el valor mínimo en CEP 349 (70%) (Tabla 13) (Figura 31).

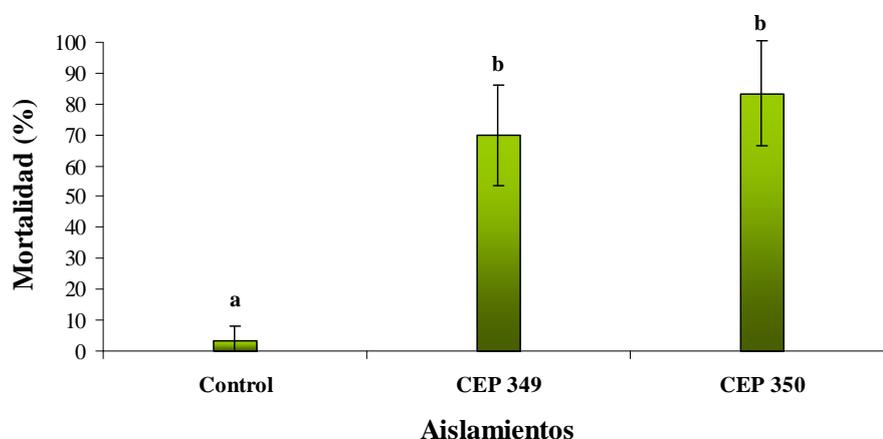
Se estimó el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) de los 2 aislamientos fúngicos infectando los adultos de *H. betulinus*. Los valores del TL<sub>50</sub> oscilaron entre 7,41 días para el aislamiento CEP 349 y 7,92 días para el aislamiento CEP 350 (Tabla 13) (Figura 32).

**Tabla 13. Determinación del porcentaje de mortalidad promedio y el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) de los aislamientos de *M. anisopliae* contra adultos de *H. betulinus*.**

Aislamiento fúngico	Mortalidad (%) <sup>*</sup>	TL 50 (Días, IC 95 %) <sup>+</sup>
Control	3,33 (4,71) a	-
CEP 349	70,00 (16,32) b	7,41 (3,72-16,00)
CEP 350	83,33 (16,99) b	7,92 (6,76-9,31)

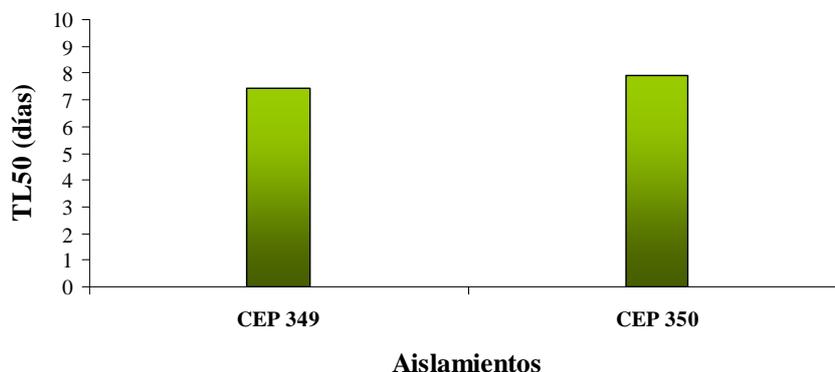
\* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) a los 15 días posteriores a la inoculación. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

+ Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) calculado con un programa Probit.



**Figura 31. Porcentaje de mortalidad confirmada de adultos de *H. betulinus* infectados con *M. anisopliae*.**

Adultos de *H. betulinus* fueron tratados con una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/ml de *M. anisopliae* e incubados durante 15 días bajo condiciones controladas ( $26 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 14 hs de luz). Diariamente, se cuantificó el número de adultos con desarrollo de micelio externo y se estimó el porcentaje de mortalidad promedio a los 15 días posteriores a la inoculación. Las barras indican el porcentaje de mortalidad confirmada y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias altamente significativas obtenidas por el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 32. Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>), en el estudio de la patogenicidad de aislamientos de *M. anisopliae* contra adultos de *H. betulinus*.**

Los 7 aislamientos fúngicos de *P. lilacinum*, no presentaron patogenicidad para estos insectos. Todos ellos produjeron una muy baja mortalidad y a esta circunstancia se añadió una mortalidad inesperada en los controles. En ninguna situación, fueron observados porcentajes de mortalidad mayores que aquellos del grupo control. Dentro de los individuos muertos en los controles ninguno presentó mortalidad por patógenos, siendo la causa de la muerte desconocida. Al realizar la corrección de la mortalidad según la Fórmula de Abbott (1925) en todos los casos se obtuvieron valores de mortalidad corregida inferiores a cero. Estos resultados carecen de significado biológico pero se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14. Determinación del porcentaje de mortalidad promedio y mortalidad corregida de los aislamientos de *P. lilacinum* contra adultos de *H. betulinus*.**

Aislamiento fúngico	Mortalidad (%)*	Mortalidad corregida (%)+
<b>Control</b>	11,66 (8,49)	-
<b>CEP 352</b>	0,00 (0,00)	- 0,14 (0,10)
<b>CEP 353</b>	3,33 (4,71)	- 0,10 (0,10)
<b>CEP 354</b>	10,00 (0,00)	- 0,02 (0,09)
<b>CEP 355</b>	3,33 (4,71)	- 0,22 (0,20)
<b>CEP 356</b>	0,00 (0,00)	- 0,14 (0,10)
<b>CEP 359</b>	6,66 (9,42)	- 0,06 (0,13)
<b>CEP 360</b>	3,33 (4,71)	- 0,10 (0,10)

\* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) a los 15 días posteriores a la inoculación.

+ Mortalidad corregida por la Fórmula de Abbott (1925).

En función de los resultados expuestos, se puede indicar que los 15 aislamientos de *B. bassiana* y los 2 aislamientos de *M. anisopliae* fueron infectivos para el “taladro de la yerba mate”. Los aislamientos de CEP 334 y CEP 335 de *B. bassiana* ocasionaron el 86,7% de mortalidad y el aislamiento CEP 350 de *M. anisopliae* ocasionó un 83,3% de mortalidad en los individuos adultos de *H. betulinus*, lo cual destaca su patogenicidad para el “taladro o tigre de la yerba mate”.

## Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos sobre individuos de *G. spegazziniana* “Rulo de la yerba mate”

### 3.3.1. Selección de los aislamientos fúngicos para las pruebas de patogenicidad de hongos Hypocreales contra *G. spegazziniana*

En la Tabla 15 se presentan los datos de los aislamientos fúngicos evaluados sobre ninfas del quinto estadio de *G. spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) en condiciones de laboratorio.

**Tabla 15. Características de los aislamientos de hongos Hypocreales a partir de suelo de cultivos de yerba mate utilizados en las pruebas de patogenicidad contra *G. spegazziniana*.**

Espece fúngica	N° Colección CEPAVE	Viabilidad conidios
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 332	99,60 % (0,29)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 333	91,93 % (3,24)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 334	89,46 % (7,48)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 335	98,15 % (0,55)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 336	98,43 % (1,22)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 337	99,43 % (0,66)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 338	99,83 % (0,12)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 339	98,60 % (0,49)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 340	95,83 % (2,94)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 341	100 % (0,00)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 342	99,33 % (0,74)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 343	97,80 % (0,14)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 344	100 % (0,00)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 345	100 % (0,00)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 346	98,83 % (0,84)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 347	100 % (0,00)
<i>Beauveria bassiana</i>	CEP 348	99,83 % (0,23)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	CEP 349	97,80 % (0,53)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	CEP 350	100 % (0,00)

---

<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 351	96,40 % (1,10)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 352	97,33 % (0,74)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 354	100 % (0,00)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 356	98,40 % (0,86)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 357	99,06 % (0,14)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CEP 360	100 % (0,00)

---

### 3.3.2. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos seleccionados

Se evaluó la patogenicidad de 25 aislamientos fúngicos, correspondiendo 17 aislamientos a *B. bassiana*, 2 aislamientos a *M. anisopliae* y 6 aislamientos a *P. lilacinum*. En todos los casos, se observó una muy baja mortalidad producida por todos estos aislamientos. Sin embargo, en los grupos controles la mortalidad fue más alta que lo esperado. Por esta razón, al realizar la corrección de la mortalidad de los grupos controles según la Fórmula Abbott (1925) en la mayoría de los casos se obtuvieron valores de mortalidad corregida inferiores a cero. Estos resultados carecen de significado biológico pero se muestran en la Tabla 16. La mortalidad de los controles no fueron superiores al 20%; dentro de los individuos muertos en los controles ninguno presentó mortalidad por patógenos, siendo la causa de la muerte desconocida. La mortalidad causada por *B. bassiana* fue comprobada al colocar los psilidos adultos muertos en cámaras húmedas y medio agar avena los que presentaron un crecimiento de micelio blanco que cubrió todo el cuerpo del insecto, adoptando un aspecto esporulado y algodonoso a las 72 hs posteriores a la muerte (Figuras 33 y 34).

**Tabla 16. Determinación del porcentaje de mortalidad promedio y mortalidad corregida de los aislamientos de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. lilacinum* contra adultos de *G. spegazziniana*.**

<b>Aislamiento fúngico</b>	<b>Mortalidad (%)*</b>	<b>Mortalidad corregida (%)<sup>+</sup></b>
<b>Control</b>	20,00 (12,47)	-
<b>CEP 342</b>	0,00 (0,00)	- 0,12 (0,21)
<b>CEP 345</b>	0,00 (0,00)	- 0,23 (0,03)
<b>CEP 344</b>	1,25 (2,16)	- 0,23 (0,03)
<b>CEP 348</b>	2,50 (4,33)	- 0,21 (0,03)
<b>CEP 346</b>	6,25 (5,44)	- 0,16 (0,06)
<b>CEP 332</b>	6,25 (4,14)	- 0,16 (0,05)
<b>CEP 335</b>	7,50 (5,59)	- 0,12 (0,07)
<b>CEP 343</b>	7,50 (5,59)	- 0,15 (0,07)
<b>CEP 333</b>	8,75 (4,14)	- 0,13 (0,04)
<b>CEP 340</b>	8,75 (5,44)	- 0,08 (0,09)
<b>CEP 336</b>	15,00 (5,00)	- 0,06 (0,06)
<b>CEP 341</b>	16,25 (12,93)	0,01 (0,10)
<b>CEP 334</b>	17,50 (10,30)	- 0,03 (0,12)
<b>CEP 339</b>	20,00 (11,72)	- 0,00 (0,14)
<b>CEP 337</b>	21,25 (13,40)	0,01 (0,14)
<b>CEP 338</b>	27,50 (11,45)	0,09 (0,14)
<b>CEP 347</b>	27,50 (10,89)	0,09 (0,13)
<b>Control</b>	11,25 (11,38)	-
<b>CEP 349</b>	2,50 (2,50)	- 0,18 (0,15)
<b>CEP 350</b>	2,50 (4,33)	- 0,29 (0,05)
<b>Control</b>	20,00 (8,49)	-
<b>CEP 351</b>	3,75 (4,14)	- 0,20 (0,05)
<b>CEP 352</b>	2,50 (4,33)	- 0,03 (0,22)
<b>CEP 354</b>	1,25 (2,16)	- 0,23 (0,03)
<b>CEP 356</b>	1,25 (2,16)	- 0,16 (0,03)
<b>CEP 357</b>	6,25 (5,44)	- 0,16 (0,06)
<b>CEP 360</b>	0,00 (0,00)	- 0,25 (0,00)

\* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) a los 10 días posteriores a la inoculación.

+ Mortalidad corregida por la Fórmula de Abbott (1925).



**Figura 33. Adultos de *G. spegazziniana* infectados con *B. bassiana*.**

Ninfas del quinto estadio de *G. spegazziniana* fueron tratados con una suspensión fúngica de  $1 \times 10^9$  conidios/ml y al cabo de 72 hs se observó el desarrollo de micelio blanco que cubrió todo el cuerpo del insecto en cámara húmeda.



**Figura 34. Adultos de *G. spegazziniana* infectados con *B. bassiana***

Al cabo de 7 días se observó el desarrollo de micelio blanco que cubrió todo el cuerpo del insecto en cápsulas de Petri con medio agar avena.

## Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por medio de técnicas moleculares

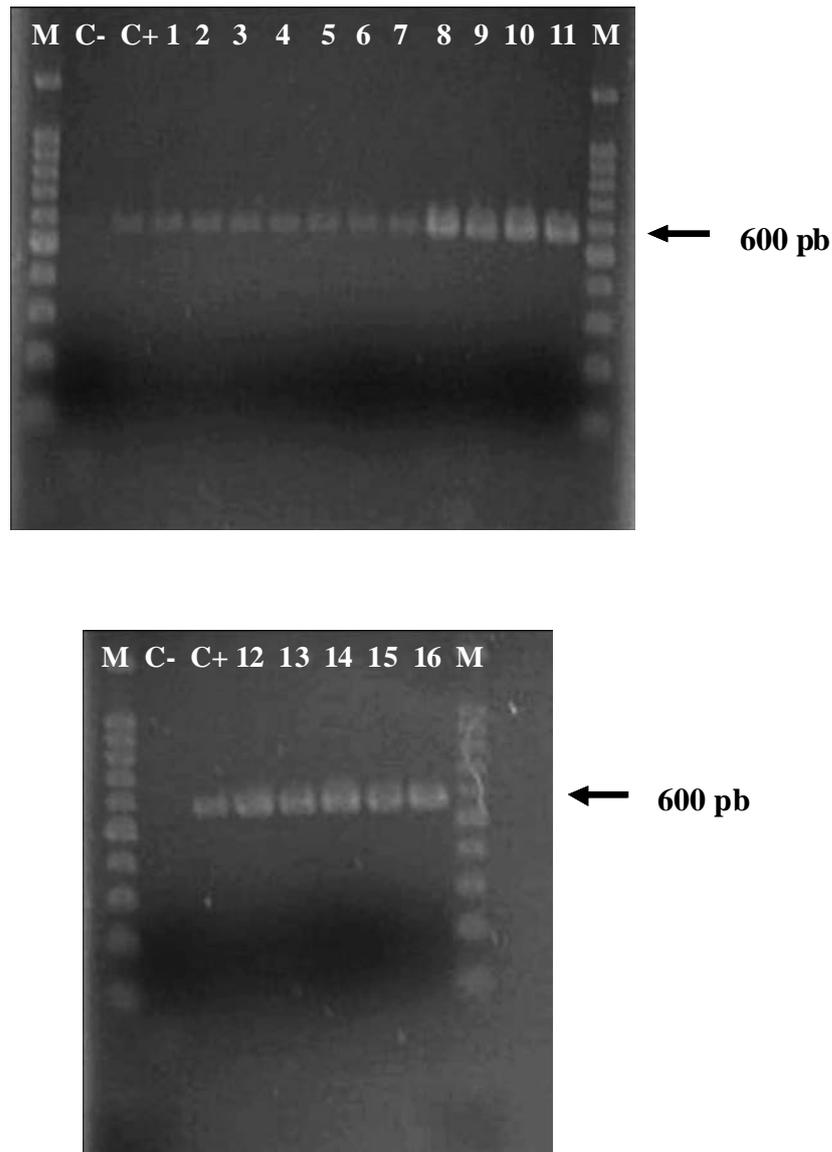
### 3.4.1. Caracterización molecular de los aislamientos de *B. bassiana* aislados de suelo de cultivos de yerba mate

Los 17 aislamientos fúngicos de *B. bassiana* fueron identificados según sus características macroscópicas y microscópicas, sin embargo, se decidió confirmar la identificación mediante técnicas moleculares. La secuenciación de la región ITS1 - 5,8S - ITS2 fue realizado para obtener diferenciación entre las especies de *Beauveria* analizadas, y así, confirmar su clasificación. De un total de 17 aislamientos fúngicos, 16 fueron aislados de suelo de cultivos de yerba mate de la provincia de Misiones (CEP 332 a CEP 348) y 1 aislamiento de referencia de la colección del CEPAVE aislado de *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) (CEP 148) (Tabla 19).

**Tabla 19. Aislamientos utilizados en la caracterización por técnicas moleculares**

N° Colección CEPAVE	Especie fúngica	Sustrato/Insecto hospedador	Región geográfica
CEP 148	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Cycloneda sanguinea</i>	Tucumán, Argentina
CEP 332	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 333	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 334	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 335	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 336	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 337	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 338	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 339	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 340	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 341	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 342	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 343	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 344	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 345	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 346	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 347	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina
CEP 348	<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo yerba mate	Misiones, Argentina

La amplificación con los *primers* ITS1 e ITS4 originó un único fragmento de aproximadamente 600 pb en todos los aislamientos fúngicos (Figura 40), correspondiendo al extremo 3' del ADN ribosomal 18S, la región espaciadora interna 1 (ITS1), el gen del ADN ribosomal 5,8S, la región espaciadora interna 2 (ITS2) y el extremo 5' del ADN ribosomal 28S.



**Figura 40. Perfil electroforético del producto de amplificación de la región ITS del ADNr (ITS1-5.8S-ITS2) utilizando los *primers* ITS1 e ITS4. M: marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb. C-: control negativo. C+: control positivo CEP 148. 1: CEP 332. 2: CEP 333. 3: CEP 334. 4: CEP 335. 5: CEP 336. 6: CEP 337. 7: CEP 338. 8: CEP 339. 9: CEP 340. 10: CEP 341. 11: CEP 342. 12: CEP 343. 13: CEP 344. 14: CEP 345. 15: CEP 346. 16: CEP 347.**

De los 18 aislamientos de *B. bassiana* que fueron sometidos al proceso de secuenciación de la región intergénica del ADN ribosomal (ITS1-5.8S-ITS2), 15 resultaron en secuencias probables de ser analizadas.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo con aquellas secuencias de diferentes especies de *Beauveria*, y que están depositadas en el Genbank (NCBI) permitió la obtención de un árbol filogenético (Figura 41). En este árbol filogenético se observa la agrupación de algunas de las especies pertenecientes al género *Beauveria*, dentro del cual se presenta una politomía entre los diferentes grupos. De acuerdo con el análisis de las secuencias ITS de los aislamientos obtenidos de suelo de cultivos de yerba mate de la provincia de Misiones, y los linajes utilizados como referencia, fue observado que los aislamientos de suelo de cultivos de yerba mate (CEP 332, CEP 333, CEP 334, CEP 335, CEP 336, CEP 337, CEP 339, CEP 340, CEP 341, CEP 342, CEP 343, CEP 344, CEP 345 Y CEP 346) y el aislamiento de referencia de la colección del CEPAVE (CEP 148) están reunidos en un único grupo monofilético, confirmando la identidad taxonómica de los aislamientos utilizados en este trabajo. Todos los aislamientos pertenecen a la especie *B. bassiana*, se muestran filogenéticamente idénticos entre sí y con los linajes de referencia de *B. bassiana*.

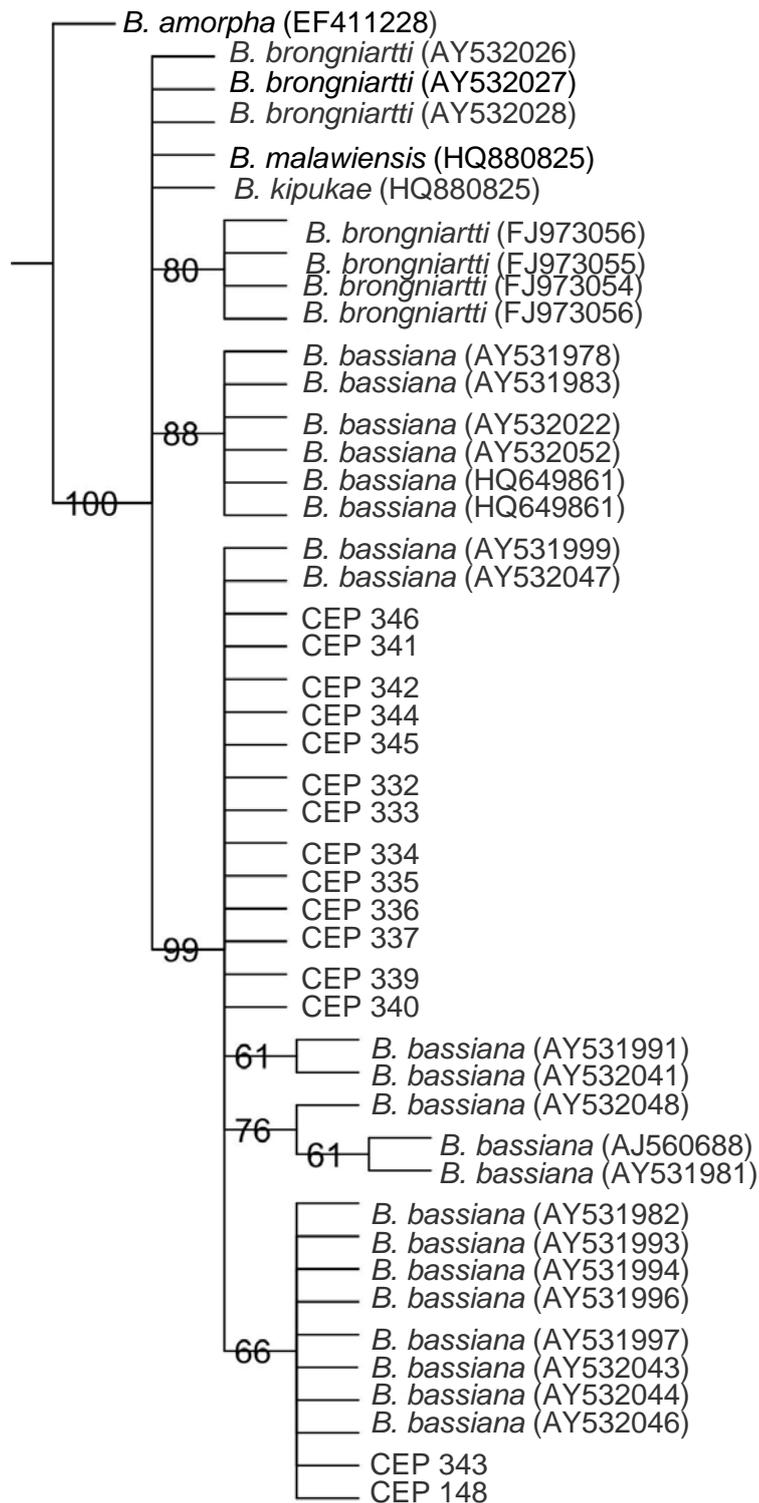


Figura 41: Árbol filogenético de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr de los aislamientos obtenidos de muestras de suelo y 31 linajes representativos de *Beauveria* provenientes del *Genbank* (NCBI) con el número de acceso indicado. El método utilizado para la construcción del árbol fue máxima parsimonia. Bootstrap de 1000 repeticiones.



# *Discusión*



## DISCUSIÓN

El relevamiento del “taladro o tigre de la yerba mate” y “rulo o psilido de la yerba mate” en cultivos de yerba mate en la provincia de Misiones, República Argentina, destacó la presencia de *H. betulinus* y *G. spegazziniana* como las principales plagas del cultivo de yerba mate. Durante los muestreos realizados en yerbales en diferentes localidades de la provincia de Misiones, *Gyropsylla spegazziniana* fue la especie predominante durante los muestreos realizados en yerbales en diferentes localidades de la provincia de Misiones, encontrándose presente durante todo el año pero pudiéndose observar un incremento de la abundancia de los insectos durante los meses de altas temperaturas. Estos registros coinciden con estudios realizados por Gallo *et al.* (1988) donde la mayor incidencia de esta plaga es en los meses de septiembre a diciembre. También, Borges (2002) demuestra que el pico poblacional para adultos de *G. spegazziniana* es de noviembre a febrero. *Hedypathes betulinus* pudo observarse presente durante todo el año con una mayor abundancia entre los meses de noviembre y marzo, donde las temperaturas son más elevadas. Estos registros coinciden con estudios citados por Soares (1998) e Iede *et al.* (2000), donde afirman que los adultos están presentes durante todo el año en los yerbales, observándose un gran número entre los meses de octubre y finales de junio, con pico poblacional entre febrero y marzo.

La prospección de hongos patógenos de estadios adultos y juveniles del “taladro de la yerba mate” y “rulo de la yerba mate” en condiciones de campo y laboratorio no han demostrado la presencia de estos insectos infectados con hongos entomopatógenos, la ausencia de los hongos entomopatógenos durante este relevamiento podría deberse a diversos factores: condiciones ambientales, disponibilidad de hospedadores susceptibles, virulencia del patógeno, características del cultivo hospedante y calidad de manejo del cultivo. No obstante, Sosa Gómez *et al.* (1994) citaron que en plantas de yerba mate, en Gobernador Virasoro, provincia de Corrientes, Argentina, se registraron niveles de infección de hasta 90% causados por el hongo *Zoophthora radicans* (Brefeld) sobre adultos de *G. spegazziniana*. En el Brasil, Alves *et al.* (2009) relataron esta misma asociación, en un yerbal en Cascavel, Paraná, Brasil, con niveles semejantes de ocurrencia de la población, siendo los únicos registros de entomopatógenos como ocurrencia natural sobre *G. spegazziniana*. Soares *et al.* (1995) y Soares e Iede (1997)

detectaron la ocurrencia natural de los géneros *B. bassiana* y *M. anisopliae* en adultos de *H. betulinus*, en un yerbal del municipio de Ivaí, Paraná, Brasil. No existen referencias bibliográficas de la ocurrencia de epizootias de estos hongos patógenos en insectos plaga de la yerba mate en Argentina. Una característica que poseen estos hongos entomopatógenos es que pueden desarrollarse tanto como patógenos en el interior de los insectos o como saprófitos en el suelo. Estas estructuras fúngicas distribuidas en el suelo pueden actuar como inóculo e infectar a insectos que estén en contacto directo con la superficie, es por esto que el hábito de los insectos sería un factor importante para determinar la posibilidad de que existan infecciones naturales ocurridas en el campo. La ausencia de infecciones causadas por estos hongos en este estudio podría ser justificada desde el punto de vista del comportamiento de los insectos, ya que raras veces se encuentran en contacto con el suelo evitando así el contagio con los hongos entomopatógenos. Los factores ambientales también cumplen una función esencial en la iniciación y desarrollo o en la prevención y supresión de las epizootias naturales afectando las condiciones fisiológicas del hospedante, su densidad y distribución espacial y temporal. Lo anteriormente expuesto conforma un complejo de factores que interactúan entre sí y entre otros componentes del ambiente, siendo los más estudiados la temperatura y humedad relativa. El mayor problema es que pocos estudios se refieren al microclima del cultivo que es el que directamente influye sobre los patógenos. A diferencia de las condiciones constantes en el laboratorio, en el agroecosistema se presentan situaciones normalmente fluctuantes del conjunto de factores climáticos. Esto explica la complejidad del tema y las múltiples interacciones posibles como para poder cuantificar, con más precisión, el efecto del microclima natural sobre los entomopatógenos (Lecuona, 1996). La ausencia de los hongos entomopatógenos en los relevamientos de *H. betulinus* y *G. spegazziniana* pudo estar influenciado por diversos factores: condiciones ambientales, disponibilidad de hospedadores susceptibles, virulencia del patógeno, características del cultivo hospedante y calidad de manejo del cultivo.

Por otra parte, los hongos entomopatógenos pueden habitar en el suelo y generar la infección de insectos. Los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* fueron detectados en el suelo de una variedad de hábitats y pueden ser aislados directamente mediante la utilización de medios de cultivos selectivos (Doberski y Tribe, 1980) o indirectamente con la incorporación de insectos trampas (larvas de *Galeria melonella* o *Tenebrio* spp.)

a las partículas de suelo (Bidochka *et al.*, 1998). En este trabajo de investigación se logró aislar e identificar diecisiete aislamientos de *B. bassiana* (59%) la especie más abundante, diez aislamientos de *P. lilacinum* (34%) y dos aislamientos de *M. anisopliae* (7%) a partir de muestras de suelo de cultivos de yerba mate orgánicos y convencionales de la provincia de Misiones, siendo estos hongos entomopatógenos también citados por otros autores como los más comunes en el suelo (McCoy *et al.*, 1992; Klingel *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2008). El aislamiento de *B. bassiana*, *P. lilacinum*, *M. anisopliae* y no de *N. rileyi* u otros entomopatógenos, los cuales se encuentran en el suelo, pudo deberse a la utilización del medio selectivo (Doberski y Tribe, 1980). En contraste, una diversidad mucho mayor de hongos entomopatógenos (750 especies) han sido registrado en hábitats tropicales, sobre todo en selvas tropicales (Evans, 1982; Grunde-Cimerman *et al.*, 1998). Por otra parte, en términos generales, *M. anisopliae* puede llegar a estar presente en el suelo más frecuentemente que *B. bassiana*, ya que este último parece ser más sensible a la interacción con la microbiota del suelo (Bidochka *et al.*, 1998), sin embargo en el presente estudio la prevalencia de *B. bassiana* fue mayor que la de *M. anisopliae*. Estudios realizados por Klingen *et al.* (2002) indicaron que el suelo proveniente de la producción agrícola orgánica presentó mayor cantidad de hongos entomopatógenos que los suelos de producción convencional; lo que concuerda con nuestros resultados, ya que en los presentes relevamientos se obtuvieron 18 de los 29 aislamientos a partir de muestras de suelo que provenían de cultivos de yerba mate orgánico, y 11 aislamientos provenían de cultivos de yerba mate de producción convencional. Tarasco *et al.* (1997) demostraron que *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron los hongos entomopatógenos más abundantes en el suelo de sur de Italia. Sin embargo, nunca se encontraron simultáneamente dos especies en el mismo suelo; lo que no concuerda con nuestros estudios ya que se pudieron aislar *M. anisopliae* y *B. bassiana* de la misma muestra de suelo. En los suelos canadienses, las especies más frecuentes fueron también *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Bidochka *et al.*, 1998). Sosa-Gómez *et al.* (2001) citaron la presencia de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *P. lilacinus* en campos de soja en Londrina, Paraná, Brasil. Borges *et al.* (2011) aislaron e identificaron hongos en un monocultivo de yerba mate, en el municipio de Campo Alegre, Santa Catarina, Brasil, los géneros identificados fueron: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Metarhizium*, *Gliocladium*, *Lecanicillium* y *Rhizopus*. Persiani *et al.* (1998) relata que la diversidad fúngica en suelo

de ecosistemas perturbados pueden favorecer la prevalencia de algunas especies de *Penicillium*, *Acreminium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Beniowskia* y *Gonytrichum*. Carvalho (2008) aisló 26 y 34 géneros de hongos a partir de suelos de cultivo de soja y algodón, respectivamente. Este autor cita que la practica sustentable de la utilización de los recursos naturales, como la labranza, puede favorecer la mantención de la biodiversidad en suelos en que ocurre la substitución de la vegetación nativa por plantaciones. Entre otros factores que pueden estar directamente asociados a la baja diversidad de la microbiota fúngica del suelo, de acuerdo con Klich (2002), están la variedad florística reducida, factores abióticos y manejo inadecuado de las áreas cultivadas. Gliessmann (2000) resalta que el manejo correcto del suelo y de los cultivos puede influenciar las dinámicas poblacionales de los organismos del suelo y que la rotación del cultivo, cultivos de cobertura y el aprovechamiento de residuos (de cultivos) y estiércol son prácticas que promueven una población biológicamente diversificada en el suelo. En yerba mate, sin embargo, pocas prácticas culturales son realizadas y Philipovski *et al.* (2003) alertan que la práctica de limpieza rutinaria realizada en ese cultivo es una de las causas fundamentales del empobrecimiento del suelo. Diversos factores pueden afectar la supervivencia de los hongos entomopatógenos en el suelo. De acuerdo a Quintela (1986), la temperatura es uno de los factores que más compromete la persistencia de *B. bassiana* en condiciones de campo. Alves y Lecuona (1998) corroboran esa información y afirman que esta especie fúngica presenta un rango óptimo de desarrollo en la temperatura de 23 a 26 °C, pudiendo soportar temperaturas de hasta 45 °C. Lingg y Donaldson (1981) demostraron que la supervivencia de los conidios de *B. bassiana* depende de la temperatura, el contenido de agua y del tipo de suelo. Asimismo, se conoce que *B. bassiana* sobrevive por más tiempo en áreas de clima templado y donde existen huéspedes para tener continuidad en su ciclo de infección (Vänninen, 1996). La humedad desempeña un importante papel para el patógeno, siendo esencial para las fases de diseminación, germinación y penetración, y limitante para la producción de algunos patógenos, siendo considerada tan importante en cuanto a la temperatura (Alves y Lecuona, 1998). Sin embargo, para estos autores, la humedad relativa que está presente sobre los insectos o en los lugares donde ellos viven (nivel microclimático) puede ser más importante para la ocurrencia de la enfermedad cuando es comparada con la humedad relativa atmosférica (nivel macroclimático). Las prácticas agrícolas como la fertilización, uso de

insecticidas, funguicidas y herbicidas afectan la persistencia de los hongos en el suelo. Sosa-Gómez y Moscardi (1994), observaron que la labranza mínima en cultivos de soja favorece la prevalencia de algunas especies de hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Paecilomyces* spp. en el suelo en comparación con zonas bajo labranza convencional, lo que concuerda con nuestros resultados ya que todos los aislamientos fúngicos fueron de muestras de suelo con labranza mínima.

Las características morfológicas de los 17 aislamientos fúngicos de *B. bassiana* (CEP 332 a CEP 348) con respecto al tamaño de los conidios coincidieron con la descripción realizada por (Samson *et al.* 1988); los diámetros de las colonias fueron levemente mayores a las presentadas por (Domsch y Gams, 1980) si bien se encontraron diferencias entre los aislamientos, en líneas generales las morfologías de las colonias fueron coincidentes con las descripciones realizadas por (Brady, 1979). Al igual que lo mencionado por dicho autor, raramente se observó la formación de sinemas por parte de los aislamientos estudiados. Las características morfológicas de los 2 aislamientos fúngicos de *M. anisopliae* (CEP 349 y CEP 350) con respecto al tamaño de los conidios coincidieron con la descripción realizada por (Kirk *et al.*, 2001; Domsch *et al.*, 1980); los diámetros de las colonias fueron mayores a las presentadas por (Domsch y Gams, 1980). Las características morfológicas de los 10 aislamientos fúngicos de *P. lilacinum* (CEP 351 y CEP 360) con respecto al tamaño de los conidios coincidieron con la descripción realizada por (Samson, 1974); los diámetros de las colonias fueron levemente menores a las presentadas por (Domsch y Gams, 1980). Algunos trabajos previos publicados por Hajek *et al.* (1990), Fargues *et al.* (1997), Ouedraogo *et al.* (1997), Sztejnberg *et al.* (1997) y Ekesi *et al.* (1999) demostraron que la temperatura óptima del crecimiento del micelio, la producción de conidios y germinación de los conidios de los hongos entomopatógenos, en condiciones de laboratorio, es de 25 °C, concordando con nuestros resultados.

Las pruebas de patogenicidad llevadas a cabo en condiciones de laboratorio con 15 aislamientos de *B. bassiana*, 2 aislamientos de *M. anisopliae* y 7 aislamientos de *P. lilacinum* aislados de suelos de cultivos de yerba mate, demostraron que los aislamientos que presentaron alta patogenicidad en adultos de *H. betulinus* son los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. El porcentaje de mortalidad para los aislamientos de *B. bassiana* varió de 53,3 a 86,7%, los aislamientos de *M. anisopliae* provocaron de 70 a 83,3% de mortalidad y los porcentaje de mortalidad de los

aislamientos de *P. lilacium* fueron muy bajos. Hafez *et al.* (1994) señalan que los niveles de infección son el resultado del contacto entre el inóculo de una cepa virulenta y la susceptibilidad de la cutícula del insecto a la germinación, penetración del tubo germinativo y finalmente el desarrollo del patógeno en el cuerpo del insecto. St Leger *et al.* (1992), sugieren que la susceptibilidad o resistencia de un insecto a un hongo en particular, puede estar determinada por los componentes de la cutícula al inicio de la infección. Otro aspecto importante en el incremento de la patogenicidad, se debe a que *B. bassiana* produce muchas enzimas extracelulares en medios nutritivos tales como proteasa, lipasa y quitinasa, las cuales están involucradas en la penetración del tegumento del hospedante y en consecuencia en la infección y su expresión está influenciada por la concentración de la cutícula y el origen de la misma en el medio de cultivo (St Leger *et al.* 1992; El Sayed 1993). Ribeiro (1993) realizó estudios en laboratorio para el control de *H. betulinus* testeando cinco cepas de *B. bassiana* aisladas de insectos encontrados en yerba mate; los resultados más promisorios fueron obtenidos con la cepa 152, aislada a partir de insectos Chrysomelidae; la infectividad de este aislamiento bajo condiciones de laboratorio fue de 69,62% en adultos y 93,02% en larvas de *H. betulinus*. Resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo de investigación fueron presentados por Pagliosa *et al.* (1994), al evaluar el aislamiento de *B. bassiana* CG 152 con una concentración de  $2,2 \times 10^8$  conidios/ml, cuya infectividad fue de 73,42 % y un  $TL_{50}$  de 9,65 días en adultos de *H. betulinus*, en laboratorio. Shimazu *et al.* (2002) evaluaron la patogenicidad de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp. en larvas del cerambicido *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky, 1853). El hongo fue aplicado sobre las larvas en una concentración de conidios de  $1 \times 10^7$  conidios/ml, siendo *B. bassiana* F0003 el más infectivo, causando 100% de mortalidad y obtuvieron un  $TL_{50}$  de 16 días. Leite *et al.* (2003) realizaron ensayos en laboratorio con pocas especies de hongos entomopatógenos, *B. bassiana* (cepa CG 716) y *Paecilomyces* sp., obtenidos de *H. betulinus* de campo. Se verificó que *B. bassiana* fue más infectivo, presentando una mortalidad de 97,5% contra 37,5% del segundo. Los tiempos medios de mortalidad fueron de 16,8 y 32 días para *B. bassiana* y *Paecilomyces* sp., respectivamente. Leite *et al.* (2006b) testearon la cepa (CG 716), en campo, formulada en dos concentraciones de aceite emulsionable y tres concentraciones de conidios. La concentración y formulación más eficiente fue de  $1 \times 10^7$  conidios/ml y 0,5% de aceite, obteniendo una infectividad

de 76% de los insectos. Los estudios realizados en condiciones de laboratorio, con *Beauveria* sp. para el control de orugas de la yerba mate *Thelosia camina* Sachus, 1920, y una especie de *Hylesia* Hubener, 1820 (Lepidoptera: Saturniidae) produjeron una mortalidad superior a 90 y 49% respectivamente (Dalla Santa *et al.* 2009). Asimismo, Leite *et al.* (2011) probaron siete aislamientos de *B. bassiana*, un aislamiento de *B. brongniartii*, un aislamiento de *M. anisopliae* y un aislamiento de *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp. contra adultos de *H. betulinus* bajo condiciones de laboratorio, fue aplicada una suspensión de conidios en una concentración de  $3,5 \times 10^7$  conidios/ml sobre los adultos de *H. betulinus*. Los aislamientos de *B. bassiana* causaron una mortalidad entre 66 a 100% y un TL<sub>50</sub> que varió de 9,8 a 26,4 días, siendo estos resultados muy similares a los obtenidos en nuestro trabajo de investigación en donde los aislamientos de *B. bassiana* presentaron una patogenicidad que varió entre 53,3% y 86,7% de mortalidad y un TL<sub>50</sub> entre 9,6 y 13,6 días. El aislamiento de *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp. presentó una mortalidad de 37,5% y un TL<sub>50</sub> de 32 días, sin embargo, en nuestros resultados los aislamientos de *P. lilacinum* no presentaron patogenicidad. Los aislamientos de *M. anisopliae* y *B. brongniartii* presentaron una mortalidad que varió de 2,1 a 31,2% y un TL<sub>50</sub> de 17 a 25,8 días, no concordando con nuestros resultados en donde los aislamientos de *M. anisopliae* presentaron una mortalidad de 70 a 83,3% y un TL<sub>50</sub> de 7,4 a 7,9 días. Normalmente, la rapidez de la mortalidad del hospedador presenta relación positiva con la concentración de los conidios (Fargues y Rodrigues-Rueda, 1980). El tiempo medio para causar la mortalidad puede estar atribuido a varios factores, entre ellos la infectividad de los aislamientos y la resistencia del insecto. La muerte rápida y la producción temprana de un gran número de esporas sobre el cadáver de insectos pueden facilitar una mayor diseminación de la enfermedad sobre sus poblaciones (Heale *et al.* 1989). De acuerdo con Bidochka y Khachatourians (1990), las proteasas son, probablemente, las enzimas más importantes en la patogenicidad de un aislamiento y su ausencia conduce a la prolongación del tiempo de mortalidad.

Las pruebas de patogenicidad llevadas a cabo en condiciones de laboratorio con 17 aislamientos de *B. bassiana*, 2 aislamientos de *M. anisopliae* y 6 aislamientos de *P. lilacinum* aislados de suelos de cultivos de yerba mate, no fueron patogénicos para los adultos de *G. spegazziniana*. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela porque en los ensayos realizados se produjo una mortalidad inesperadamente alta en los controles, parte de esta mortalidad puede ser explicada por la biología de esta

especie. Según Leite y Zanol (2001) la longevidad de los adultos de *G. spegazziniana*, fue de 43,7 días para los machos y 15,2 días para las hembras, siendo el ciclo completo de 82,4 días para los machos y de 53,9 días para las hembras. Para Oglobin (1929) el ciclo completo lleva 40 días. Morawick *et al.* (1995) observaron que los machos tenían una longevidad de 28 a 32 días y las hembras duraban de 8 a 12 días; el ciclo completo llevo 65 días para los machos y 45 días para las hembras. Sabedot *et al.* (1999) observaron la longevidad de las hembras en 9,24 días y de los machos 12 días cuyo ciclo total fue de 27,29 días. Chiaradia *et al.* (2000) observaron una longevidad de 9,24 días para las hembras y 12 días para los machos. Esto podría explicar parte de la mortalidad observada, debido a que el boensayo fue evaluado hasta el décimo día, donde todos los insectos ya estaban en la fase adulta. Para confirmar la ausencia de patogenicidad de estos aislamientos habrían de realizarse nuevos bioensayos. Hasta el presente no existen referencias bibliográficas de estudios de patogenicidad de hongos entomopatógenos contra *G. spegazziniana*. Puterka *et al.* (1994) evaluaron dos aislamientos de *B. bassiana* para el control del psilido de la pera *Cacopsylla pyricola* (Foerster), la concentración de conidios utilizados fue de  $1 \times 10^7$  conidios/ml aplicadas sobre ninfas del tercer estadio, el control obtenido para este psilido de la pera fue de 40,6%, 85,6% 92,5% para el aislamiento (2430), y de 57,4%, 93,8% y 99,6% para el aislamiento (2860) evaluados en el 3°, 5° y 7° día después de la aplicación respectivamente, el psilido de la pera presento un tiempo medio de mortalidad de 2,9 días para el aislamiento de *B. bassiana* (2430) y 3,2 días para el aislamiento de *B. bassiana* (2860). Este mismo autor evaluó un aislamiento de *L. lecanii* para el control del psilido de la pera *Cacopsylla pyricola* (Foerster), aplicadas sobre ninfas del 3° estadio, el control obtenido para este psilido fue de 17%, 81,1% y 98,6% en el 3°, 5° y 7° día después de la aplicación, respectivamente. Leite *et al.* (2005) evaluaron los aislamientos de *L. lecanii* CG 902 y CG 904 para el control de *Cinara atlantica* y obtuvieron una mortalidad de 67,3% y 64,1% respectivamente. Gassen (2006) evaluó la patogenicidad de los hongos *B. bassiana* (IBCB 66), *M. anisopliae* (IBCB 425) y *L. lecanii* (JAB 02) sobre el psilido de la guayaba *Triozoida* sp. (Hemiptera: Psyllidae). Cada rama de guayaba con los psilidos fue pulverizado con 20 ml con las siguientes concentraciones del patógeno:  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $5 \times 10^8$  conidios/ml. Las tres especies de hongos entomopatógenicos testeadas fueron patogénicas al psilido de la guayaba, en todas las concentraciones evaluadas. Para el hongo *B. bassiana* las

mayores concentraciones testeadas proporcionaron las mayores mortalidades al final de las evaluaciones, siendo 67 y 77% de mortalidad confirmada en las concentraciones de  $1 \times 10^8$  y  $5 \times 10^8$  respectivamente; para *M. anisopliae* el porcentaje de mortalidad confirmada fue mucho menor, siendo que las concentraciones fueron las más elevadas, presentando 35 y 32% en las mismas concentraciones. La mayor mortalidad fue obtenida en la concentración de  $5 \times 10^7$  con 44%, para ambas especies fúngicas la concentración de  $5 \times 10^6$  fue la que causó menor mortalidad (26%). Sin embargo *L. lecanii* demostró ser más patogénico para el psílido de la guayaba, casuando una mortalidad mucho mayor que para las otras dos especies en todas las concentraciones utilizadas en el ensayo, logrando con la concentración de  $5 \times 10^8$  un porcentaje de mortalidad del 90%. Favaro (2006) evaluó la patogenicidad de dos aislamientos de *Lecanicillum* sp. y un aislamiento de *Beauveria* sp. sobre el psílido del eucalipto *Glycaspis* (*Glycaspis*) *brimblecombei* (Moore, 1964) (Hemiptera: Psyllidae). Los aislamientos de *Lecanicillum* sp. utilizados fueron obtenidos del pulgón gigante de los pinos, *Cinara atlantica* (Wilson, 1919) (Hemiptera: Aphididae) en plantaciones de pino localizados en Paraná (CG 904) y Santa Catarina (CG 902) Brasil; el aislamiento de *Beauveria* sp. (BF 01) fue obtenido con la captura de adultos muertos en plantaciones de eucaliptos localizados en la ciudad industrial de Curitiba, Brasil. Cada muda de eucalipto con ninfas de *G. brimblecombei* fueron pulverizados con un mini-pulverizador manual con 1,4 ml de la suspensión fúngica ajustada para  $1,5 \times 10^7$  conidios/ml. El aislamiento de *Beauveria* sp. controló el 81% de la población inicial, con un tiempo medio de mortalidad de 4,86 días; ambos aislamientos de *Lecanicillum* sp. (CG 904 y CG 902) infectaron adultos y ninfas de *G. brimblecombei*, causando una mortalidad de 80 y 66% respectivamente, el tiempo medio de mortalidad fue de 6,52 para CG 904 y 7,03 días para CG 902, los dos aislamientos de *Lecanicillum* sp. causaron menor mortalidad y mayor tiempo medio de mortalidad que el aislamiento de *Beuaveria* sp.

En Argentina no existen antecedentes previos sobre la utilización de hongos entomopatógenos para controlar las poblaciones del “taldro de la yerba mate” y el “rulo de la yerba mate”. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son el primer registro sobre la acción de aislamientos nativos de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. lilacinum* en cultivos de yerba mate de la provincia de Misiones. La búsqueda de hongos entomopatógenos nativos de las principales plagas de cultivos de yerba mate, así como el estudio de la compatibilidad de éstos con otros métodos de

control merecen ser abordados para ampliar el conocimiento sobre la diversidad y así poder encontrar organismos eficientes como agentes de control biológico en el campo.

La taxonomía fúngica es extremadamente importante debido al papel que los hongos desempeñan en la naturaleza particularmente los entomopatógenos, que son utilizados en el control biológico de insectos plaga de la agricultura (Lima, 1989). La taxonomía clásica del género se basa en criterios morfológicos, sin embargo en la actualidad las técnicas de biología molecular son utilizadas para identificar y caracterizar la variabilidad genética de los hongos entomopatógenos. En general, una de las principales desventajas de la caracterización morfológica es que las características a medir son limitadas en número, por lo cual la discriminación entre aislamientos es difícil. Por otro lado, la presencia de estas especies en diversos climas y condiciones agroecológicas, indicaría la existencia de una alta variabilidad genética en la especie. Actualmente, la forma más certera de determinar los niveles de diversidad y estructura genética intraespecífica es a través del uso de marcadores moleculares (Becerra, 2007). Principalmente se han usado cuatro tipos de marcadores moleculares para determinar la diversidad genética en hongos entomopatógenos: los fragmentos de restricción polimórficos (RFLP) (Maurer *et al.*, 1997), el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Piatti *et al.*, 1998; Gaitan *et al.*, 2002), las secuencias simples repetidas (SSR) (Kretzner *et al.*, 2000), ITS 1 y 2 del ADNr (Buscott *et al.*, 1996; Coates *et al.*, 2002). Las secuencias ribosomales nucleares, especialmente los ITS 1 y 2, han mostrado tasas diferenciales en cambios nucleotídicos, lo cual permite la comparación de aislamientos a nivel inter e intraespecífico en hongos (Neuvéglise *et al.*, 1994; Buscott *et al.*, 1996; Iturralde, 2005). En este trabajo de investigación se analizaron 17 aislamientos fúngicos correspondientes a la especie *B. bassiana*, la caracterización consistió en la amplificación del gen nuclear (espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal). Los espaciadores transcritos internos (ITS1-5,8S-ITS2) fueron amplificados con los *primers* ITS1 e ITS4 obteniendo un fragmento de aproximadamente 600 pb, lo cual coincide con trabajos realizados por otros autores (Carneiro *et al.*, 2008; Santoro *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2011). La secuenciación de la región ITS permitió una comparación con secuencias obtenidas de otros linajes de *Beauveria* ya conocidas; y el alineamiento y análisis filogenético confirmaron la identidad taxonómica de los aislamientos analizados. Nuestros resultados muestran claramente que los 16 aislamientos de suelo de yerba mate y 1 aislamiento de referencia de la colección del CEPAVE se agrupan

junto con *B. bassiana*. Rehner *et al.* (2005) analizaron los genes nucleares (ITS1-5,8S-ITS2 y EF1- $\alpha$ ) para el estudio de 86 aislamientos de hongos entomopatógenos de diversos orígenes geográficos, habitats e insectos hospedadores; los análisis filogenéticos utilizando máxima parsimonia y métodos bayesianos permitieron la elaboración de un árbol filogenético con 6 clados bien definidos dentro de *Beauveria*, designados como A-F; demostrando que existe una alta variabilidad genética en *B. bassiana*, pudiéndose caracterizar dos clados: clado A y clado C. Asimismo, Santoro *et al.* (2008) compararon los análisis de la secuencia de la región (ITS1-5,8S-ITS2) obtenida para el aislamiento (UNIOESTE 4) y aquellas secuencias depositadas en la base de datos NCBI, confirmando su posición taxonómica como perteneciente a *B. bassiana* del clado A. Siendo estos resultados similares a los obtenidos en nuestros estudios, ya que los 17 aislamientos analizados se agruparon taxonómicamente como *B. bassiana* del clado A. Estos resultados reafirman que la variabilidad detectada en las secuencias ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr es una herramienta útil para discriminar diferentes especies de hongos, incluyendo *B. bassiana*. No obstante, otros genes deberían ser secuenciados, como el gen de factor de elongación de proteínas (EF1- $\alpha$ ), para confirmar los resultados obtenidos.



# Conclusions

## CONCLUSIONES

- Como resultado de la prospección de hongos patógenos del “taladro o tigre de la yerba mate” y “rulo o psilido de la yerba mate” en cultivos de yerba mate de la provincia de Misiones República Argentina, se recolectaron adultos y estadios juveniles de *Hedypathes betulinus* y *Gyropsylla spegazzinianana* desde mayo de 2008 hasta septiembre de 2010, no pudiéndose observar infecciones fúngicas en los mismos en condiciones de campo y laboratorio.
- Se obtuvieron 29 aislamientos *in vitro* de hongos entomopatógenos del Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales, a partir de muestras de suelo de cultivos de yerba mate de la provincia de Misiones. Correspondiendo 17 aislamientos a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., 2 aislamientos a *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok y 10 aislamientos a *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Hywel-Jones & Samsom.
- Los aislamientos nativos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* resultaron ser patogénicos para *H. betulinus*, ya que presentaron un porcentaje de mortalidad superior al 50% y 70%, respectivamente. Sin embargo, no se observó patogenicidad para los aislamientos nativos de *P. lilacinum*.
- Los aislamientos nativos de *B. bassiana* presentaron muy baja patogenicidad para *G. spegazziniana*. La patogenicidad de los aislamientos nativos de *M. anisopliae* y *P. lilacinum* fue nula.
- Los análisis filogenéticos de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN permitió confirmar la identificación de los 14 aislamientos de *B. bassiana* provenientes de suelo de cultivos de yerba mate y 1 aislamiento de referencia de la colección del CEPAVE, perteneciendo todos a la misma especie.



# *Perspectivas futuras*

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados de esta tesis abren nuevas posibilidades de estudios con miras a ampliar el conocimiento de hongos entomopatógenos como potenciales agente de control biológico de *Hedypathes betulinus* y *Gyropsylla spegazziniana* insectos plaga de cultivos de yerba mate, de importancia económica en nuestro país. Los futuros trabajos de investigación podrán ser orientados hacia los siguientes temas:

- Desarrollar la producción *in vitro* de los hongos aislados y evaluados en el presente estudio para llevar a cabo liberaciones a campo en pequeña escala para conocer la capacidad infectiva de estos hongos en condiciones de campo.
- Realizar la evaluación de los hongos entomopatógenos junto a otros enemigos naturales y evaluar la patogenicidad de estos hongos sobre organismos “no blanco”.
- Estudiar la interacción de los hongos entomopatógenos con agroquímicos y con productos derivados de la yerba mate para determinar posibles antagonismos o sinergismos.
- Profundizar sobre el estudio de la relación de los hongos con distintos tipos de suelo, pH, temperatura del suelo y humedad relativa.



# Bibliografía

**BIBLIOGRAFÍA**

- Alencar F.R. 1960. Erva-mate. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola. 23 pp.
- Altieri M.A. 1989. Agroecologia: as bases científicas da agricultura alternativa. Rio de Janeiro: PTA/FASE, Cap. 1: Introdução à agroecologia. 1-12 pp.
- Alves S.B. 1986. Controle microbiano de insetos. Brasil. Editora Manole. 407 pp.
- Alves S.B., Almeida J.E.M., Moino J.R. y Alves L.F.A. 1998. Técnicas de laboratório. In ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos, Ed. Fealq. 637-711 pp.
- Alves, S.B.; Lecuona, R.E. 1998. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano In: Controle microbiano de insetos. 2ª ed. Piracicaba, SP: FEALQ. 97-170 pp.
- Alves S.J., Lopes L., Alves A. y Moino Jr. 1998. Controle microbiano de artrópodos associados a doenças de plantas. In I.S. Melo and J.L. Azevedo (eds.). Controle Biológico. Jaguariúna, CNPMA – Embrapa, Brasil. 264 pp.
- Alves S.B. 1998. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ.
- Alves L.F.A., Leite L.G. y Oliveira D.G.P. 2009. Primeiro Registro de *Zoophthora radicans* (Brefeld) (Entomophthorales: Entomophthoraceae), sobre Adultos da Ampola da Erva-Mate (*Gyropsylla spegazziniana* Lizer & Trelles) (Hemíptera: Psyllidae), no Brasil. Neotrop. Entomol. 38 (5): 697-698.
- Anuário brasileiro da erva-mate. 1999. Santa Cruz do Sul. Editora Gazeta. 64 pp.
- Azevedo A.C.S., Furlaneto M.C., Sosa-Gómez, D.R. y Fungaro M.H.P. 2000. Molecular characterization of *Paecilomyces fumoroseus* (Deuteromycotina Hyphomycetes) isolates. Sci. Agric. 57: 729-732.

- Becerra V.V., Paredes C., Rojo C.M. y France A.L. 2007. RAPD e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*. *Agric. Téc. (Chile)*. 67 (2): 115-125.
- Benny G.L., Humber R.A. y Morton J.B. 2001. Zygomycota: Zygomycetes. En: McLaughlin, McLaughlin, Lemke (Eds.) *The Mycota VII. A Systematic and Evolution*. Springer-Verlag, Berlín.
- Berryman A. 1999. The theoretical foundations of biological control. En: Hawkins B.A. y Cornell H.V. (Eds). *Theoretical approaches to biological control*. Cambridge University Press, England. 3-21 pp.
- Bidochka M.J. y Khachatourians G.G. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factors in pathogenicity towards the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invert. Pathol.* 56: 362-370.
- Bidochka M.J., McDonald M.A., St. Leger R.J. y Roberts D.W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Genet.* 25: 107-113.
- Bidochka M., Kasperski J. y Wild G.A. 1998. Ocurrance of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitat. *Can. J. Bot.* 76: 1198-1204.
- Bidochka M.J., St. Leger R.J., Stuart S. y Gowanlock K. 1999. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular protease and carbohydrases. *Microbiology*. 145: 955-963.
- Bischoff J.F., Rhener S.A y Humber R.A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. 101 (4): 512-530.

- Boman H.G., Faye I., Gudmundsson G.H., Lee J.Y. y Lidholm D.A. 1991. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.* 201: 23-31.
- Borges L. 2002. Flutuação populacional de insetos em dois sistemas de cultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., e análise de sujidade no produto final. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Curitiba, Paraná. Universidade Federal do Paraná. 76 pp.
- Borges L.R. y Lazzari S.M.N. 2008. Flutuação populacional de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) em dois sistemas de cultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St.-Hil.(Aquifoliaceae) Floresta, Curitiba, v. 38, n. 2.
- Borges L.R., Noemberg Lazzari S.M., Chapaval Pimente I. y Vila Nova M.X. 2011. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Ver. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient. Curitiba*, 9 (2): 185-194.
- Boucias D.G., Maccoy C.W. y Joslyn D.J. 1982. Isoenzyme differentiation among 17 geographical isolates of *Hirsutela thompsonii*. *J. Invert. Pathol.* 39: 329-337.
- Boucias D.G. y Pendland J.D. 1998. *Principles of insect pathology*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London. 537 pp.
- Boucias D.G., Tigano M.S., Sosa-Gómez D.R., Glare T.R. e Inglis P.W. 2000. Genotypic Properties of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi*. *Biol. Control.* 19: 124-138.
- Bowman B.H., Taylor J.W., Brownlee A.G., Lee J., Lu S.D. y White T.J. 1992. Molecular evolution of the fungi: relationships of the Basidiomycetes, Ascomycetes and Chytridiomycetes. *Mol. Biol. Evol.* 9: 285-296.

- Brady B.L.K. 1979. *Beauveria bassiana* C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 602. Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Brandão Filho J.S. 1945. Uma broca do mate. Boletim Agrícola: secção formação agrícola, Curitiba, 3 (8/9): 55-58.
- Burchardtk D. 1994. Psylloidea pests of temperate and subtropical crop and ornamental plants (Hemiptera: Psylloidea): a review. Trends Agric. Sci. Entomol. 2: 173-186.
- Burtnik O.J. 2003. Manual del pequeño yerbatero correntino. INTA – Agencia de Extensión Rural Santo Tomé, Corrientes. 1-30 pp.
- Buscott F., Wipf D., Di Battista C., Munch J.C., Botton B. y Martin F. 1996. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed-PCR. Mycol. Res. 100: 63-71.
- Bustillo A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de entomología. Bogotá. 30-53 pp.
- Candido Filho J. 1929. A broca da erva mate (*Hedypathes betulinus*, Klug). O Matte, Curitiba. 1 (2): 13-14.
- Cantone F.A. y Vandenberg J.D. 1998. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol. Res. 102: 209-215.
- Carneiro A.A., Gomes E.A., Teixeira Guimarães C., Tavares Fernandes F., Portilho Carneiro N. y Cruz I. 2008. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. Pesq. Agrop. Bras. Brasília. 43 (4): 513-520.

- Carpanezzi A.A. 1995. Cultura do mate no Brasil: conflitos e lacunas. In: H. Winge A.G., Ferreira J.E.A., Mariath y L.C. Tarasconi (ed.), Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul. Porto Alegre, Ed. Universidade. 43-47 pp.
- Carvalho P.E.R. 1994. *Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire; erva-mate. In: Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília: EMBRAPA-SPI. 280-287 pp.
- Carvalho V.G. 2008. Comunidades de fungos em solo do cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo de soja e algodão. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Cassanello A.M.L. 1993. Ciclo de vida e aspectos morfológicos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae), broca-da-erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Curitiba, 1993. 59f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Caver M., Gross G.F. y Woodward, T.E. 1991. Hemiptera (Bugs, leafhoppers, cicadas, aphids, scale insects, etc) p. 429-509 In: Cornell University Press (ed.) The insect of Australia. A Text book for students and research workers. Vol. 01, 2a ed., Ithaca New York. 542 pp.
- Charnley A.K. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. En: Anderson J., Rayner A. y Walton D. Invertebrate-microbial Interactions. Cambridge University Press. Cambridge. 229-270 pp.
- Chase M.R., Raina K., Bruno J. y Sugumaran M. 2000. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidasas from *Sarcophaga bullata*. Insect Biochem. Molec. Biol. 30: 953-967.

- Chiaradia L.A. y Milanez J.M. 1997. Atratividade de armadilhas coloridas a *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer, 1917) (Homoptera: Psyllidae). Pesquisa agropecuária gaúcha. Porto Alegre. 3 (2): 183-185.
- Chiaradia L.A. 2000. Aspectos da ecologia de *Gyropsylla spegazziniana* (LIZER, 1917) (Hemíptera, Psyllidae) em erva-mate. 2º Congresso Sul-Americano da Erva Mate e 3ª Reunião Técnica da Erva Mate. 469 pp.
- Chiaradia L.A., Milanez J.M. y Sabedot S.M. 2000. Caracterização e danos da ampola-da-erva-mate. Pesquisa Agropecuária Gaúcha 13(1): 50-53.
- Coates B., Hellmich R. y Lewis L. 2002. Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. Genome 45: 125-132.
- Corrêa G.S. y Azevedo J.L. 1986. Efeito do solo na germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. O Solo. 78 (1): 39-41.
- Costa E.M. de M.B., Pimenta F.C., Luz C., Oliveira V., Oliveira M., Bueno E. y Petrofeza S. 2011. *Beauveria bassiana*: quercetinase production and genetic diversity. Braz. J. Microbiol. 42: 12-21
- Crocomo W.B. 1990. Manejo de pragas. Botucatu, SP: Ed. Universidade Estadual Paulista. 157 pp.
- d'Avila M. 2002. Influência de algunos fatores ambientais sobre o comportamento de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Santa Maria, 2002. 142f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Da Croce D.M. 2000. Cadeias produtivas de Santa Catarina: Erva-mate. Epagri, Florianópolis. 41 pp.

- Dalla Santa H.S. 2000. Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin em resíduos agroindustriais para controle biológico de *Thelosia camina* (Shaus, 1920) e *Hylesia* sp.; pragas da erva-mate. Curitiba. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 96 pp.
- Dalla Santa H.S., Sousa N.J., Pittner E., Dalla Santa O.R. y Soccol C.R. 2009. Controle biológico em pragas de *Ilex paraguariensis* (A. St.-Hil.) com fungo *Beauveria* sp. Floresta. 39: 67-76.
- De Coll O. y Saini E.D. 1992. Insectos y ácaros perjudiciales al cultivo de la yerba mate en la Republica Argentina. E.E.A. Montecarlo. Publicación Nro. 1. INTA. 48 pp.
- De Coll O.R. y Saini E.D. 1993. Enemigos naturales de los insectos y acaros perjudiciales al cultivo de la Yerba Mate em la Republica Argentina. INTA, E.E.A. Montecarlo, Argentina. 31 pp.
- Dent D. 1991. Insect pest management. Wallingford: CAB Internacional. 604 pp.
- Diaz C.Y.F. 1997. Perspectiva del manejo integrado de plagas en yerba-mate. In: Congresso Sul Americano de Erva-Mate. 2. 1997 Curitiba. Anais. Colombo. EMBRAPA-CNPQ. 371-390 pp.
- Dobersky J.W. y Tribe H.T. 1980. Isolation of entomogenous fungi from elm bark beetle and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Trans. Br. Mycol. Soc. 74: 95-100.
- Domsch H. y Gams W. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press Ltd. New York, U.S.A. 859 pp.
- Driver F., Milner R.J. y Trueman J.W.H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycol. Res. 104: 143-150.

- Dunn P.E. 1991. Insect antibacterial protein. In: Warr, G.W., N. Cohen (eds.), *Phylogenesis of Immune Function*. Plenum Press. Boca Raton, Florida. 19-44 pp.
- Duperchy E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 111 pp.
- Eilenberg J., Hajek A. y Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*. 46: 387-400.
- Ekesi S., Maniania N.K. y Ampong-Nyarko K. 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Sci. Techn.* 9: 177-185.
- Elrod-Erickson M., Mishra S. y Schneider D. 2000. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr Biol*. 10: 781-784.
- El Sayed G.N., Ignoffo C.M., Leathers T.D. y Gupta S.C. 1993. Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Mycopathol*. 122 (1): 79-87.
- EMBRAPA Erva-mate, 2004. [http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/erva\\_mate/ervamate.htm](http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/erva_mate/ervamate.htm).
- Evans H.C. 1982. Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. *Ecol. Entomol*. 7: 47-60.
- Fargues J. y Rodrigues-Rueda D. 1980. Sensibilité dès larves de *Spodoptera litorales* (Lepidoptera: Noctuidae) aux hyphomycètes entomopathogènes *Nomuraea rileyi* et *Paecilomyces fumosoroseus*. *Entomophaga*. 25: 43-54.

- Fargues J., Reisinger O., Robert P.H. y Aubart C. 1983. Biodegradation of entomopathogenic hyphomycetes: Influence of clay coating on *Beauveria bassiana* blastospores survival in soil. *J. Invert. Pathol.* 41: 131- 142.
- Fargues J. y Roberts P.H. 1985. Persistence dos conidiospores des hyphomycetes entomopathogenes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Nomurea rileyi* (F.) Sanson et *Paecilomyces fumoroseus*. Wige dans le sol, en conditions controlees. *Agronomie.* 5: 73-80.
- Fargues J., Ouedraogo A., Goettel A.M.S. y Lomer C.J. 1997. Effect of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Sci. Techn.* 7: 345–356.
- Favaro M.R. 2006. Aspectos bionômicos de *Glycaspis* (*Glycaspis*) *brimblecombei* (Moore, 1964) (Hemiptera: Psyllidae) e seu controle com fungos entomopatogênicos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Curitiba, Paraná. Universidade Federal do Paraná. 35-42 pp.
- Fernandes G.W.A. y Martins R.P 1985. As galhas. *Ciência Hoje.* 4 (19): 58-64.
- Ferron P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Ver. Entomol.* 23: 409-442.
- Ferron P. 1985. Fungal control. En: Kerkut G.I y Gilbert L.I. (Eds.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.* Oxford, Pergamon. 4: 313-346.
- Fiorentino D.C. y Diodato L. 1997. Manejo de plagas producidas por insectos forestales. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Ed. El Liberal, Santiago del Estero, Argentina.

- Flores R.E. 1983. Control del psilido de la yerba mate (*Gyropsylla spegazziniana*). Informe técnico N° 39. Estación experimental agropecuaria. Misiones. Argentina. 12 pp.
- Gaitan A., Valderrama A., Saldarriaga G., Velez P. y Bustillo A. 2002. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee Berry borer (*Hypothenemus hampei*) and other insects. Mycol. Res. 11: 1307-1314.
- Galileo M.H.M., Martins U.R. y Moura L. de A. 1993. Sobre o comportamento, ontogenia e morfologia do aparelho reprodutor de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae, Aconthoderini) a broca da erva-mate. Rev. Bras. Entomol. São Paulo. 37 (4): 705-715.
- Gallo D., Nakano O., Silveira N.S., Carvalho R.P.L., Batista G.C., Berti F.E., Parra J.R.P., Zucchi R.A., Alves S.B. y Vendramin J.D. 1988. Manual de Entomologia Agrícola. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 649 pp.
- Gama F.C., Teixeira C.A.D., Garcia A., Costa J.N.M. y Limav D.K.S. 2005. Influência do ambiente na diversidade de fungos associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera, Scolytidae) e frutos de *Coffea canephora*. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 72 (3): 359-364.
- Gaseen M.H. 2006. Patogenicidade de fungos entomopatogênicos para o psílideo da goiabeira *Trizoida* sp. (Hemíptera: Psyllidae) e compatibilidade de agrotóxicos utilizados na cultura da goiaba sobre estes agentes de controle biológico. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Proteção de Plantas). Botucatu, São Paulo. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.
- Gaugler R., Costa S.D. y Lashomb J. 1989. Stability and efficacy of *Beauveria bassiana* soil inoculations. Environ. Entomol. 18: 412-417.
- Gliessmann S.R. 2000. Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável. Porto Alegre: Editora Universidade.

- Goloboff P.A., Farris J.S. y Nixon K.C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*. 24:774-786.
- Gaf V. y Marzagão R.M. 1999. Ocurência do parasitóde *Labena fiorii* sp.n (Hymenoptera, Icheumonidae) em larvas de *Hedypathes betulinus* (Klug), brica da erva mate e em *Chydarteres striatus* (Fabricius), broca da aroeira, (Coleptera, Cerambycidae). *Ver. Brás. Zool.* 16 (1): 185-190.
- Grunde-Cimerman N., Zalar P. y Jerm S. 1998. Mycoflora of cave cricket *Troglophilus neglectus* cadavers. *Mycopathol.* 144: 111–114.
- Guedes J.V.C. 2000. Manejo cultural e agroecológico de insetos. In: Guedes, J.V.C.; Costa, I.D.da; Castiglioni, E. (orgs.). Bases e técnicas do manejo de insetos. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS: Pallotti. 248: 99-112.
- Hafez M., Zaki F.N., Moursy A. y Sabbour M. 1994. Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the Potato tuber moth *Pthorimaea operculella* (Seller). *Journal of Islamic Academy of Sciences*. Vol. 7, Nº 4. Available at [http://www.medicaljournal-ias.org/7\\_4/Hafez.htm](http://www.medicaljournal-ias.org/7_4/Hafez.htm).
- Hajek A.E., Carruthers R.I. y Soper R.S. 1990. Temperature and moisture relation of sporulation and germination by *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthoraceae), a fangal pathogen of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymontriidae). *Environ. Entomol.* 19: 85-90.
- Hajek A.E. y St. Leger R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- Hajek A.E. y Delalibera I. 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl.* 55: 147-158.
- Heale J.B., Isaac J.E. y Chandler D. 1989. Prospects for strain improvement in entomopathogenic fungi. *Pestic. Sci.* 26 (1): 79-92.

- Hibbett D.S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans. Mycol. Soc. Jap.* 33: 533-556.
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lucking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., Matheny P.B., Mc Laughlin D.J., Powell M.J., Redhead S., Schoch C.L., Spatafora J.W., Stalpers J.A., Vilgalys R., Aime M.C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G.L., Castlebury L.A., Crous P.W., Dai Y., Gams W., Geiser D.M., Griffith G.W., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Koljalg U., Kurtzman C.P., Larsson K., Lichtwardt, R., Longcore J., Mia Dlikowska J., Miller A., Moncalvo J., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J.D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J.P., Schußler A., Sugiyama J., Thorn R.G., Tibell L., Untereiner W.A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M.M., Winka K., Yao Y. y Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 3: 509– 547.
- Hodge K.T. 2003. Clavicipitaceous Anamorphs. En: White, J.F.; Bacon, C.W.; Hywel Jones, N.L.; Spatafora, J.W (Eds.). *Clavicipitaceous fungi, evolutionary biology, chemistry biocontrol and cultural impacts.* Marcel Dekker, NY.
- Hodge K.T. 2006. *Clavicipitaceous anamorphs.* Dekker Reprint Program.
- Humber R.A. 1984. Foundations for an evolutionary classification of the Entomophthorales (Zygomycetes). En: Wheeler Q, Blackwell M, eds. *Fungusinsect relationships.* New York: Columbia University Press.
- Humber R.A. 1997. *Fungi: Identification.* En: *Manual of Techniques in Insect Pathology.* Ed. L. Lacey. Academic Press. San Diego, California. 53-185 pp.
- Humber R.A. 2002. Collection of entomopathogenic fungal cultures, US, Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS. 110-177 pp.

- Humber R.A. 2012. *Entomophthoromycota*: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. *Mycotaxon*. 120: 477-492.
- Iede E.T. y Machado D.C. 1989. Pragas da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e seu controle. EMBRAPA/CNPQ. Colombo. Bol. Pesq. Flor. 18/19: 51-60.
- Iede E.T., Soares C.M.S., Grigoletti Jr. A. y Auer C.G. 2000. Identificação de pragas e doenças da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) Embrapa/CNPQ. Colombo. 24 pp.
- Ignoffo C.M., Garcia C., Hostetter D.L. y Pinell R.E. 1978. Stability of conidia of an entomopathogenic fungus *Nomureae rileyi*, in and on soil. *Environ. Entomol.* 7: 724-727.
- Ignoffo C.M. 1981. The fungus *Nomureae rileyi* as microbial insecticide. En: Burges H.D (Ed.). *Microbial control of pest and plant diseases*. London, Academic Press. 513-538 pp.
- Inglis P.W. y Tigano M.S. 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. *Genet. Mol. Biol.* 29 (1): 132-136.
- INYM, 2012. <http://www.inym.org.ar/inym/imagenes/Estadisticas/stats-04-12.pdf>.
- Iturralde M.J. 2005. Identificación genética de hongos. Sociedad Micológica de Madrid. Disponible en <http://www.socmicolmadrid.org/noti/noticias30.html>.
- James R.R., Buckner J.S. y Freeman T.P. 2003. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *J. Invert. Pathol.* 84: 67-74.

- Jenkins N.E., Heviefo G., Langewald J., Cherry A.J. y Lomer C.H.J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*. 19: 21-31.
- Jensen A.B. y Eilenberg J. 2001. Genetic variation within the insect-pathogenic genus *Entomophthora*, focusing on the *E. muscae* complex, using PCR-RFLP of the ITS II and the LSU rDNA. *Mycol. Res.* 103 (3): 307-312.
- Joslyn D.J. y Boucias D.G. 1980. Isoenzyme differentiation smong three pathotypes of entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. *Can. J. Microbiol.* 27: 364:366.
- Kan H., Kim C.H., Kwon H.M., Park J.W., Roh K.B., Lee H., Park B.J., Zhang R. Zhang J., Soderhall K., Ha N.C. y Lee B.L. 2008. Molecular control of phenoxidase-induced melanin synthesis in an insect. *J. Biol. Chem.* 283: 25316-23.
- Kessler P., Matzke M.H. y Keller S. 2003. The effect of application time and soil factors on the occurrence of *Beauveria brongniartii* applied as biological control agent in soil. *J. Invert. Pathol.* 84: 15-23.
- Kessler P., Enkerli J., Schweizer C. y Keller S. 2004. Survival of *Beauveria brongniartii* in the soil after application as biocontrol agent against the European cockchafer *Melolontha melolontha*. *BioControl*. 59: 563-581.
- Khachatourians G.G. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In *The Mycota VI. Human and Animal Relationships*, Howard/Miller eds., Springer-Verlag, Berlin. 331-364 pp.
- Kirk R.M., Cannon P.F., David J.C. y Stalpers J.A. 2001. *Ainsworth & Bisby 's Dictionary of the fungi*. Edited Cabi Publishing. 624 pp.
- Klich M.A. 2002. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*. 94 (1): 21-27.

- Klingel I., Eilemberg J. Meadow R. 2002. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agr. Ecosyst. Environ.* 91: 191-198.
- Kretzner A.M., Molina R. y Spatafora J.W. 2000. Microsatellite markers for the ectomycorrhizal basidiomycete *Rhizopogon vinicolor*. *Mol. Ecol.* 9: 1190-1191.
- Lacey L.A. y Brooks W.M. 1997. *Manual of techniques in insect pathology*. Ed. Lacey L.A., Academic Press Inc., San Diego, California. USA.
- Lacey L.A., Frutos R., Kaya H.K. y Vails P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?. *Biol. Control.* 21: 230-248.
- Landa Z., Osborne L., López F. y Eyal J. 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biol. Control.* 4: 341-350.
- Lane B.S., Humphreys A.M., Thompson K. y Trinci A.P.J. 1988. ATP content of stored spores of *Paecilomyces farinosus* and the use of ATP as a criterion of spore viability. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 90: 109-148.
- Lanza L.M., Monteiro A.C. y Malheiros E.B. 2004. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. *Ciência Rural, Santa Maria.* 34 (6): 1757-62.
- Latge J.P. y Boucias D.G. 1984. Intraespecific variability in *Conidiobolus obscurus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30: 135-150.
- Lecuona R.E. 1996. *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga*. Ed. Buenos Aires, Argentina: Talleres gráficos Mariano.
- Lecuona R.E. 1999. Control microbiano con hongos entomopatógenos en la Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Arg.* 58 (1-2): 301-306.

- Leite M.S.P., Soares C.M.S., Iede E.T., Penteadó S.R.C. y Castellano C. 2000. Seleção de linhagens de fungos entomopatogênicos para o controle de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) em laboratório e eficiência da linhagem selecionada em campo. II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica da Erva-mate. Encantado, Ed. dos Organizadores. 314-317 pp.
- Leite M.S.P y Zanol K.M.R. 2001. Biología e morfología de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera, Psyllidae). Acta Biol. Par., Curitiba, 30 (1, 2, 3, 4): 19-34.
- Leite M.S.P., Zaleski S.R.M., Penteadó S.R.C., Camargo J.M.M. y Ribeiro R.D. 2003. Patogenicidade de cepas do fungo *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas no controle de *Cinara atlantica* (Wilson, 1919) (Hemíptera: Aphididae). In: Simpósio sobre cinara em Pinus, 1. 2003, Curitiba. Anais... Colombo: Embrapa Florestas, Cd-Rom.
- Leite M.S.P., Penteadó S.R.C., Zaleski S.R.M., Camargo J.M.M. y Ribeiro R.D. 2005. Seleção de isolados de *Verticillium lecanii* para controle de *Cinara atlantica*. Pesq. Agrop. Bras. 40 (11): 1141-44.
- Leite M.S.P., Iede E.T. y Penteadó S.R.C. 2006a. Manejo Integrado de Pragas em erva-mate para o controle da broca-da-erva-mate, com ênfase ao uso de entomopatógenos. 2006. In: IV Congresso Sudamericano de la Yerba Mate. Cd-Rom.
- Leite M.S.P., Iede E.T., Penteadó S.R.C., Zaleski S.R.M., Camargo J.M.M. y Ribeiro R.D. 2006b. Eficiência de *Beauveria bassiana* (BALS) Vuill formulado em óleo no controle de *Hedypathes betulinus* (Klug) (Coleoptera: Cerambycidae) em campo. In: IV Congresso Sudamericano de la Yerba Mate. 269-272 pp.
- Leite M.S.P., Zanol K.M.R., Iede E.T. y Penteadó S.R.C. 2007. Flutuação populacional de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera, Psyllidae) e de seus

- inimigos naturais em erva-mate no município de São Mateus do Sul, PR, Brasil. Rev. Bras. 51 (4): 520-523.
- Leite M.S.P., Iede E.T., Penteadó S.R.C., Zaleski S.R.M., Camargo J.M.M. y Ribeiro R.D. 2011. Seleção de isolados de fungos entomopatogênico para o controle de *Hedypathes betulinus* e avaliação da persistência. Rev. Floresta 41 (3): 619-628.
- Levitin A. y Whiteway M. 2008. *Drosophila* innate immunity and response to fungal infections. Cell. Microbiol. 10: 1021-1026.
- Liang Z.A. y Liu J. 1995. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. Acta Mycologica. 10: 257-262.
- Lima E.A.L.A. 1989. Aspectos taxonômicos y citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84 (Sup.III): 17-20 pp.
- Lingg A.J. y Donaldson M.D. 1981. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. J. Invert. Pathol. 39: 191-200.
- López Lastra C.C. 1988. Nuevas especies de insectos hospedadores para el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en Argentina y consideraciones sobre su patogenia. Rev. Fac. Agr. UNLP. Tomo LXIV (entregas 1 y 2).
- López Lastra C.C. 1989. Primera cita de *Cordyceps sobolifera* (Ascomycotina: Pyrenomycetes) patógeno de insectos en la República Argentina. Bol. Soc Bot. Arg. 26 (1-2): 59-60.
- López Lastra C.C. 1990. Primer registro de *Aphanocladium album* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) como patógeno de insectos en la República Argentina. Bol. Soc. Arg. Bot. 26 (3-4): 259-260.

- López Lastra C.C. y Scorsetti A.C. 2006. Hongos Entomophthorales patógenos de insectos de la República Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 52 (4): 311- 315.
- López Lastra C.C. y Scorsetti A.C. 2007. Revisión de los hongos Entomophthorales (Zygomycota: Zygomycetes) patógenos de insectos de la República Argentina. *Bol. Soc. Bot. Arg.* 42 (1-2): 33-37.
- Lourenço A.P., Zufelato M.S., Bitondi M.M.G. y Simões Z.L.P. 2005. Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 35: 541-552.
- Lusangsa-ard J., Houbraken J., van Doorn T., Hong S-B., Borman A.M., Hywel-Jones N.L. y Samson R.A. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Lett. Microbiol.* 32: 141-149.
- Madelin M.F. 1963. Diseases caused by hyphomycetous fungi. In: *Insect pathology, an advanced treatise Vol. 2.* Steinhaus, E.A. (Ed.). Academic Press, New York. 687 pp.
- Mani 1964. *Ecology of plant galls.* Dr. W. Junk Deen Haag Xii. 434 pp.
- Marchionatto J.B. 1934. Algunos hongos entomógenos comunes en la República Argentina y las posibilidades de su aplicación agrícola. *Rev. Fac. Agr. y Vet. Univ. Buenos Aires.* 7: 571- 584.
- Marmaras V.J., Charalambidis N.D. y Zervas C.G. 1996. Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31: 119-133.
- Maurer P., Coutaoudier Y., Girard P.A., Bridge P.D. y Riba G. 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol. Res.* 101: 159-164.

- Mattos N.F. 1982. Estudos preliminares sobre pragas da erva-mate. Instituto de pesquisas naturais renováveis. IPRNR n. 9, Porto Alegre-RS-Brasil. 18 pp.
- Mazuchowski J.Z. 1991. Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Curitiba, EMATER. 104 pp.
- McCoy C.W., Tigano M.S. y Storey J.K. 1992. Environmental factors affecting entomopathogenic fungi in the soil. *Pesq. Agrop. Bras.* 27: 107-112.
- Meister M., Lemaitre B. y Hoffmann J.A. 1997. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioassays.* 19: 1019-1026.
- Meyer W., Koch A., Niemann C., Beyermann B., Epplen J.T. y Börner T. 1991. Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. *Curr. Genet.* 19: 239-242.
- Meyling N.V. 2008. PCR-based characterization of Entomopathogenic fungi for ecological studies. Deliverable 5.2 from VegQure. Department of Agriculture and Ecology Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark.
- Miranda N. y Urban T. 1998. Engenhos e barbaquás. Curitiba, Ed. Posigraf. 120 pp.
- Morawicki P.M., Diaz C.I.F. y Tricio A.E. 1995. Ciclo de vida de *Gyropsylla spegazziniana* (L.,1917) Psyllidae-Homoptera. "Psilídeo de la yerba mate". In: Congreso Argentino de Entomología. 3: 299.
- Mullis F., Falcama F., Scharf S., Snikl R., Horm G. y Erlich H. 1986. PCR a practical approach. Oxford University Press, Oxford.
- Murrin F. 1996. Fungi and insects. En: Howard D.H. y Miller J.D. (Eds.). *The Mycota VI. Human and Animal Relationship*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 365-388 pp.

- Neuvéglise C. y Brygoo Y. 1994. Identification of group-I introns in the 28s rDNA of the entomopathogenic fungus *Beauveria brogniartii*. *Curr. Genet.* 27: 38-45.
- Nirula K.K. 1957. Observations on the green muscardine fungus in populations of *Oryctes rhinoceros* L. *J. Econ. Entomol.* 50 (6): 767-770.
- Obornik M., Stouthamer R., Meekes E. y Schilthuitzen M. 1999. Molecular characterization and phylogeny of the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. *Plant Protect. Sci.* 35: 1-9.
- Oglobin A.A. 1929. Metamorfosis de *Metaphalara spegazziniana*, (Liz) Crwf. Ver. Yerbateira Misiones. N° 3. 15-18 pp.
- Oliveira R.C., Alves L.F.A y Neves P.M.O.J. 2000. Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* ao ácaro vermelho da erva-mate. II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica da Erva-mate. Encantado, Ed. Dos Organizadores. 318- 321 pp.
- Ouedraogo A., Fargues J., Goettel M.S. y Lomer C.J. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathol.* 137: 37-43.
- Ouedraogo R., Cusson M., Goettel M. y Brodeur J. 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J. Invert. Pathol.* 82: 103-109.
- Pagliosa M.M.R., Santos H.R. y Diodato M.A. 1994. Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) praga da erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hill. *Agrárias, Curitiba.* 13 (1-2): 229-231.

- Papierok B. y Hajek A.E. 1997. Fungi: Entomophthorales. En: Lacey L, (Ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. San Diego, California: Academic Press. 187-211 pp.
- Papierok B. 2007. Isolating, growing and storing arthropod pathogenic Entomophthorales. En: Keller S. (Ed.) Arthropod-pathogenic Entomophthorales: biology, ecology; identification. COST Action 842. Luxembourg. 66–81 pp.
- Pedrosa-Macedo J.H. 1993. Manual de pragas em florestas: pragas florestais do sul do Brasil. Visçosa: IPEF/SIF. 110 pp.
- Pell J.K., Eilenberg J., Hajek A.E. y Steinkraus D.C. 2001. Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. En: Butt T.M., Jackson C.W., Magan N. (Eds.) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI International, Oxon. 71–153 pp.
- Penteado S.R.C. 1995. Principais pragas da erva-mate e medidas alternativas para o seu controle. In: H. Winge, A.G. Ferreira, J. E. A. Mariath e L. C. Tarasconi (ed.), Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul. Porto Alegre, Ed. Universidade. 356 pp.
- Pentado S.R.C., Iede E.T. y Leite M.S.P. 2000. Pragas da erva-mate: perspectivas de controle. In: Congresso Sul-Americano da erva-mate, 2, e reunido técnica da erva-mate, 3. Encantado. Anais. Porto Alegre, Edição dos organizadores. 27-38 pp.
- Pereira R.M., Alves S.B. y Sosa-Gómez D.R. 1998. Utilização de entomopatógenos no manejo integrado de pragas. In: Alves, S.B. 1998, Controle Microbiano de Insetos. 2 ed. Piracicaba, SP: FEALQ.
- Persiani A.M. *et al.* 1998. Diversity and variability in soil fungi from a disturbed tropical rain forest. Mycologia. 90 (2): 206-214.

- Philipovski J.F., Dedereck R.A. y Medrado M J.S. 2003. Conservação do solo na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* S. Hill.) pelo uso de coberturas verdes de inverno. Comunicado Técnico, n. 102, Embrapa.
- Piatti P., Cravanzola F., Bridge P. y Ozino O. 1998. Molecular characterization of *Beauveria brongniartii* isolates obtained from *Melolontha melolontha* in Valle d' Aosta (Italy) by RAPD-PCR. Lett. Appl. Microbiol. 26: 317-324.
- Poprawski, T.J.; Riba, G.; Jones, W.A.; Aioun, A. 1988. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from Sitona weevils (Coleoptera: Curculionidae). Environ. Entomol. 17: 275-279.
- Prado H. 2001. Solos do Brasil. 2.ed. Piracicaba : H. Prado. 220 pp.
- Prat Kricun S.D. 1986. Informe sobre investigaciones realizadas no período de 1984.-85: INTA. E. E. A. Cerro Azul, 32 p. Misiones, 1984 (Miscelanea, 15).
- Puterka G. J., Humber R.A. y Poprawski T.J. 1994. Virulence of fungal pathogens (Imperfect fungi: Hyphomycetes) to pear psylla (Homoptera: Psyllidae). Environ. Entomol. 22 (2): 514-520.
- Quintela E.D. 1986. Estabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes) no solo e sua patogenicidade ao *Chalcodermus aeneus* Boheman (Col: Curculionidae), praga do caupi. Dissertação de Mestrado, ESALQ/ USP, Piracicaba. 101 pp.
- Quintela E.D., Lord J.C., Alves S.B. y Roberts D.W. 1992. Persistência de *Beauveria bassiana* em solo de cerrado e sua interação com microorganismos do solo. An. Soc. Entomol. Bras. 21 (1): 69-81.

- Rath A.C., Koen T.B., y Yip H.Y. 1992. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pastures soils. *Mycol. Res.* 96: 378-384.
- Reddy M.P., Sarla N. y Siddiq E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphyt.* 128: 9-17.
- Rehner S.A. y Buckley E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia.* 97(1): 84-98.
- Ribeiro M.M. 1993. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em *Hedypathes betulinus* (Klug, 1925) (Coleoptera: Cerambycidae), em condições de laboratório e de campo. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 58 pp.
- Ribeiro M.M. 2005. Influência da adubação nitrogenada na Incidência de *Gyropsylla spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) praga da erva-mate cultivada. Tese (Doutorado) -UFPR, Curitiba.
- Richard F.J., Aubert A.C. y Grozinger M. 2008. Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology.* 6: 1-13.
- Sabedot S. M., Milanez J.M., García F.R.M. y Chiaradia L.A. 1999. Biología de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer, 1917) (Hemiptera: Psyllidae) em laboratório. *Acta Biol. Leopoldensia.* 21(2): 203-212.
- Shah P.A., Kooyman C. y Paraiso A. 1997. Surveys for fungal pathogens of locust and grasshoppers in Africa and Near East. In: Goettel M. y Johnson D. (Eds). *Microbial control of grasshoppers and locusts.* Mem. Entom. Soc. Can. 171: 27-35.

- Samson R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Study in Mycology. N° 6.
- Samson R.A. 1975. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Studies in Mycology. Centrealbureau voor Schimmelcultures, Baarn. 6: 1-119.
- Samson R.A., Evans H.C. y Latgé J.P. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Ed. Springer-Verlag, Berlin. 300 pp.
- Samuels R.I. y Paterson I.C. 1995. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. Comp. Biochem. Physiol. 110: 661-669.
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences. 74: 5463-5467.
- Santoro P.H., Oliveira Janeiro Neves P.M., Moretto T., Sartori D., Angeli Alves L.F. y Pelegrinelli Fungaro M.H. 2008. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. J. Invert. Pathol. 97: 83-90.
- Schaerffenberg B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarrhizium*. J. Insect Pathol. 6: 8-20.
- Scherer R.A. 1997. Early selection of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) In: Argentina. Boon: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universitat. 58 pp.
- Scorsetti A.C. 2007a. Estudios relativos a los hongos patógenos de insectos plaga en cultivos hortícolas como potenciales agentes de control biológico. Trabajo de tesis doctoral. FCNyM, UNLP, La Plata, Buenos Aires, República Argentina. 151 pp.
- Scorsetti A.C., García J.J., Humber R.A. y López Lastra C.C. 2007b. Natural occurrence of entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) of

- aphid* (Hemiptera: Aphididae) pests of horticultural crops in Argentina. *Biocontrol*. 52: 641-655.
- Scorsetti A.C., Humber R.A., De Gregorio C. y López Lastra C.C. 2008. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*, pests of horticultural crops, in Argentina. *BioControl*. 53: 787-796.
- SENASA. 2011. <http://www.senasa.gov.ar/indexhtml.php>.
- Shah P.A. y Pell J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 61: 413-423.
- Shapiro S.L., Astin J.A., Bishop S.R. y Cordova M. 2005. Mindfulness-based stress reduction for health care professionals: Results from a randomized trial. *Int. J. Stress Manage*. 12 (2): 164-176.
- Sharapov V.M. y Kalvish T.K. 1984. Effect of soil fungistasis on zoopathogenic fungi. *Mycopathol*. 85 (2): 121-128.
- Shields M.S. 1981. Identification of a *Penicillium urticae* metabolite which inhibits *Beauveria bassiana*. *J. Invert. Pathol*. 38 (3): 374-377.
- Shimazu M., Zhang B. y Liu Y. 2002. Fungal pathogens of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) and their virulences. *Bulletin of FFPRI*. L1. 1123-1130 pp.
- Soares C.M.S., Santos H.R. e Iede E.T. 1995. Avaliação do parasitismo natural de *Eurytoma* sp. (Hymenoptera: Eurytomidae) em ovos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae). In: Congresso de entomología (15: 1995: Caxambú). Anais. Caxambú: Sociedade Entomológica do Brasil. 311 pp.

- Soares C.M.S. e Iede E.T. 1997. Perspectivas para o controle da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus* Klug, 1825) (Col.: Cerambycidae). In: Congresso Sul-americano da erva mate; reunião técnica do cone sul sobre a cultura da erva mate, 2, Curitiba. Anais, Curitiba. (Documentos 33). 391-400 pp.
- Soares C.M.S. 1998. Flutuação populacional, aspectos comportamentais e levantamento de inimigos naturais de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae), em um povoamento puro de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Curitiba, 1998. 73f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Sosa-Gómez D.R. y Alves S.B. 1983. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. I. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. CIRPON Rev. Invest. 1 (3): 83-102.
- Sosa-Gómez D.R. y Alves S.B. 1984. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorok. II. Producción de conidios en diferentes medios de cultivo y sobre cadáveres de larvas de *Diatraea saccharalis* (F.)
- Sosa-Gómez D.R., Kitajima E.W. y Rolon M.E. 1994. First records of entomopathogenic diseases in the Paraguay tea agroecosystem in Argentina. Florida Entomologist. 7: 378-382.
- Sosa-Gómez D.R. y Moscardi F. 1994. Effect of till soybean cultivation on dynamics of entomopathogenic fungi in the soil. Florida Entomologist. 77: 284-287.
- Sosa-Gómez D.R. y Alves S.B. 2000. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). An. Soc. Entomol. Bras. 29 (3): 515-521.
- Sosa-Gómez D.R., Delpin K.E., Moscardi F. y Farias J.R.B. 2001. Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces* in soybean under till and no-till cultivation systems. Neotrop. Entomol. 30 (3): 407-410.

- Sosa-Gómez D.R., López Lastra C.C. y Humber R.A. 2010. An overview of Arthropod-Associated Fungi from Argentina and Brazil. *Mycopathol.* 170: 61-76.
- Sousa N.J. 1999. Aspectos biológicos, ecológicos de microorganismos. In: Memórias seminário: Possibilidades del control biológico en plantaciones forestales de Colombia – Programa de protección forestal. CONIF – MINAMBIENTE – BIRIF, Santafé de Bogotá, Colômbia.
- Starks P., Blackie C.A. y Seeley T. 2000. Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften.* 87: 229-231.
- St. Leger R.J., Charnley A.K. y Cooper R.M. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J. Invert. Pathol.* 47: 295-302.
- St. Leger R.J., Frank D.C., Roberts D.W. y Staples R.C. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle degrading-protease structural gene from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem.* 204: 991-1001.
- St. Leger R.J., Allee L.L., May B., Staples R.C. y Roberts D.W. 1992. World-wide distribution of genetic variation isolates of *Beauveria* spp. *Mycol. Res.* 96: 1007-1015.
- Steinhaus E.A. 1985. Microbial disease of insects. *Ann. Ver. Microbiol.* 165-189 pp.
- Storey G.K., Gardner W.A. y Tollner E.W. 1989. Penetration and persistence of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia in soil of two tillage systems. *Environ. Entomol.* 18: 835-839.
- Studdert, J.P.; Kaya, H.K. 1990. Water potencial, temperature and soil type on theation of *Beauveria bassiana* soil colonies. *J. Invert. Pathol.* 56 (3): 380-383.

- Sturion J.A. y Resende M.D.V. 1997. Programa de melhoramento genético da erva-mate no Centro Nacional de Pesquisa de Floresta da Embrapa. In: I Congresso Sul Americano da Erva-Mate. II Reunião técnica do Cone Sul sobre a cultura da erva-mate. 2. Curitiba. Anais. Colombo. EMBRAPA-CNPQ. 467 pp.
- Sun B.D., Yu Y.H., Yen A.J. y Liu X.Z. 2008. Insect-associated fungi in soils of Field crops and orchards. *Crop Protection*. 27: 1421-1426.
- Sung G.H., Hywel-Jones N.L., Sung J.M., Luangsa-ard J.J., Shreshtha B. y Spatafora J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.* 57: 5-59.
- Sztejnberg A., Doron-Shloush S. y Gerson U. 1997. The biology of the acaropathogenic fungus, *Hirsutella kirchneri*. *Biocontrol Sci. Techn.* 7: 577-590.
- Tanada Y. y Kaya H. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, California, USA. 666 pp.
- Terrasco E., De Bievre C., Papierok B., Polisenio M. y Triggiano O. 1997. Occurrence of entomopathogenic fungi in soils in southern Italy. *Entomológica*. 31: 157-166.
- Throne J.E., Weaber D.K., Chew V. y Baker J.E. 1995. Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *J. Econ. Entomol.* 88: 1510-1512.
- Tigano-Milani M.S., Gomes A.C.M.M. y Sobral B.W.S. 1995a. Genetic Variability among Brazilian Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* 65: 206-210.
- Tigano-Milani M.S., Honeycutt H.J., Lacey L.A., Assis R., Mc-Clelland M. y Sobral B.W.S. 1995b. Genetic variability *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *J. Invert. Pathol.* 65: 274-282.

- Toledo A.V., Scorsetti A.C., Dikgolz V.E. y López Lastra C.C. 2004. *Paecilomyces fumosoroseus* y *Nomuraea rileyi* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), hongos patógenos de insectos plaga de la agricultura en la Argentina. Bol. Soc. Bot. Arg. 39 (1-2): 21-26.
- Toledo A.V., Giambelluca L., Marino de Remes Lenicov A.M. y López Lastra C.C. 2008. Pathogenic fungi of planthoppers associated with rice crops in Argentina. Int. J. Pest Manag. 54 (4): 363-368.
- Tzean S.S., Hsieh L.S. y Wu W.J. 1997. Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan. Council of Agriculture, Executive Yuan.
- Valduga E. 1995. Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 97 pp.
- Van Lenteren J.C. y Woets J. 1998. Biological and integrated pest control in greenhouses. Ann. Rev. Entomol. 33: 239-269.
- Vänninen I. 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. Mycol. Res. 100: 93-101.
- Vänninen I., Tyni-Juslin J. y Hokkanen H. 2000. Persistence of augmented *Metarrhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in finish agricultural soils. BioControl. 45: 201-222.
- Vega E.F. y Blackwell M. 2005. Insect fungal associations. Ecology and Evolution. Oxford University Press, Inc. USA.
- Walstad J.D., Anderson R.F. y Stambaugh W.J. 1969. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*). J. Invert. Pathol. 16: 221-226.

- Wang S.B., Miao X.X., Zhao W.G., Huang B., Fan M.Z., Li Z.Z. y Huang Y.P. 2005. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycol. Res.* 109: 1364-1372.
- White I.M. y Hodkinson I.D. 1985. Ninfal taxonomy and systematic of the Psylloidea (Homoptera) *Bull. Bri. Mus. (Nat. hist) Entomol.* 50: 153-301.
- White T.J., Burns T., Lee S. y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Edited by Innis, M.A.; Gelfand; D.H., Sninsky, J.J.; White, T.J. Academic Press, San Diego. 315 -322 pp.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. y Tingey S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wilson K. y Reeson A.F. 1998. Density-dependent prophylaxis: evidence from Lepidoptera- baculovirus interactions?. *Ecol. Entomol.* 23: 100-101.
- Wilson K., Thomas M., Blanford S., Doggett M., Simpson S. y Moore S. 2002. Density-dependent disease resistance in desert locusts. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 99: 5471-5475.
- Yasem de Romero M. 1984. Primera cita de *Cordyceps dipterigena* Berck. & Br. (= *Hymenostilbe dipterigena* Petch) para la República Argentina. *CIRPON Rev. Invest.* 2 (1-2): 65- 69.
- Zietkiewicz E., Fafalski A. y Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* 20: 176-183.

---

**ANEXO****Medios de cultivos:****AGAR EXTRACTO DE MALTA 2% (MEA) (Stevens, 1974)**

- Agar-agar	20g
- Extracto de malta	20g
- Peptona de carne	1g
- Dextrosa	20g
- Agua destilada	1000 ml

**SABOURAUD DEXTROSA AGAR con 1% de extracto de levadura (SDYA) (Goettel e Inglis, 1997)**

- Peptona	10g
- Dextrosa	20g
- Agar	20g
- Extracto de levadura	10g
- Agua destilada	1000 ml

**MEDIO SELECTIVO PARA AISLAR *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* DESDE MUESTRA DE SUELO (Doberski y Tribe, 1980)**

-Glucosa	40g
-Peptona (Difco)	10g
-Agar	15g
-Cristal violeta	0,01g
-Cycloheximida	0,25g
-Dodine (acetato de N-dodecilguanidinio)	0,25g
-Cloranfenicol	0,5g

-Agua destilada 1000 ml

Los antibióticos y antifúngicos se agregan al medio después de esterilización por autoclave cuando el medio está aún líquido a una temperatura por debajo de los 60 °C.

### **MEDIO DE ESPORULACIÓN (ME)**

-Agar 20g  
-Mix 4,6g  
-Dextrosa 10g  
-Extracto de levadura 5g  
-Agua destilada 1000 ml

#### Mix:

-NaNO<sub>3</sub> 1,58g  
-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36 g  
-MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,6g  
-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 1,05g  
-KCL 1g

### **MEDIO AGAR AVENA**

-Agar 20g  
-Dodine 550mg  
-Harina de avena 20g  
-Agua destilada 1000 ml

### **Antibióticos:**

- Cloranfenicol 250mg/50ml agua destilada estéril.
- Gentamicina 25mg/50ml agua destilada estéril.

Ambos antibióticos fueron esterilizados por filtrado a través de filtros de 20 µm de diámetro (Fisherbrand). Usar 0,1 ml de antibiótico por cada 100 ml de medio de cultivo.

**Colorantes:****Azul de algodón-Lactofenol de Amann (Stevens, 1974):**

-Fenol (cristales)	20g
-Acido láctico	20g (16ml)
-Glicerol	40g (31 ml)
-Azul de algodón	0,05-1g
-Agua destilada	20g (20ml)

**Buffer y soluciones:****Tris HCl 1M (pH=8)**

-Tris base	121,1g
-Agua destilada	100 ml

Ajustar el pH hasta 8 con HCl concentrado.

**SDS 10%**

-SDS	10g
-Agua destilada	100 ml

**EDTA 0,5M (pH=8)**

-EDTA	18,61g
-Agua destilada	100 ml

Ajustar el pH hasta 8 con pastillas de NaOH.

**NaCl 5M**

-NaCl	29,22g
-Agua destilada	100 ml

**Fenol saturado en Tris-HCl**

-Fenol 500g

-Tris HCl

Ajustar el pH hasta 8.

**Cloroformo-Alcohol Isoamílico**

-Cloroformo 24 ml

-Alcohol isoamílico 1 ml

**Buffer TE**

-Tris base 1,21g

-EDTA 0,37g

-Agua destilada 1000 ml

Ajustar el pH hasta 8.

**Buffer de corrida TEB 10X**

-Tris base 108g

-Ácido bórico 55g

-EDTA 0,5M pH=8 7,78g

-Agua destilada 1000 ml

Ajustar el pH hasta 8,3.

En el momento de usar diluir 1:10 en agua destilada, para llegar a una concentración 1X.

**Bromuro de etidio (1%)**

-Bromuro de etidio 100mg

- Agua destilada 10 ml

