

“Capacidad biocida de hongos entomopatógenos para el control de plagas del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en la provincia de Jujuy, República Argentina”

Lic. María Florencia Vianna.

Directores

Dr. Pelizza, Sebastián A.

Dra. Scorsetti, Ana C.

Lugar de Trabajo:

Instituto de Botánica C. Spegazzini

Facultad de Ciencias Naturales y Museo- UNLP

La Plata, 2018.

No existen límites en lo que queda por descubrir en la interacción entre macro- y microorganismos, en la que están en juego mutualismos y antagonismos. Los microorganismos recubren el planeta, y en su infinita variedad deben estar implicados en infinitas interacciones. Descifrarlas podría llevar a incrementar el conocimiento ecológico como a aislar productos naturales de función nunca antes vista..... ¡Qué comience la aventura!

Berenbaum & Eisner 2008

Agradecimientos

A mis directores Dra. Ana Clara Scorsetti y Dr. Sebastián Pelizza por su apoyo, paciencia y por acompañarme en todo el proceso de realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Marta Cabello, directora del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini por permitirme trabajar con total libertad en dicha Institución.

Al Ms. Ing. Agr. Sergio Rodriguez por su amabilidad, asesoramiento constante y por recibirnos cálidamente en la provincia de Jujuy.

A Anita Bucsinsky, por su sabiduría, generosidad y cariño.

A la Dra. Leticia Russo, por su amistad y constante apoyo.

Al Dr. Sebastián Stenglein por su predisposición y colaboración con el análisis de secuencias.

A las Dra. Andrea Toledo y Dra. Cecilia Mourellos por su colaboración con el análisis de secuencias y filogenia molecular.

A mis compañeros del Instituto Spegazzini, gracias por los momentos vividos y compartidos en este período.

A mis amigas que me han acompañado en el camino recorrido, incluso a la distancia.

A mi familia, especialmente a mis padres y hermanos por su cariño y apoyo constante, por estar siempre que los necesito, los quiero.

A la familia que formamos con Bruno, Pedro y Titi, que son mi respaldo siempre, los amo profundamente.

A mi familia

Contenido

Agradecimientos.....	3
Contenido	5
Resumen y Abstract.....	8
Resumen	9
Abstract	12
Introducción	15
El cultivo de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	16
La producción del tabaco.	17
Etapas en la producción.	20
Manejo de Productos Fitosanitarios	21
Principales plagas	22
Manejo de artrópodos.....	23
Manejo Integrado de Plagas (MIP)	23
Control Biológico (CB).....	25
Hongos entomopatógenos	26
Ciclo de vida de los hongos entomopatógenos.....	30
Contacto con el huésped	31
Penetración en el huésped	31
Hongos endófitos	36
Hongos entomopatógenos como endófitos.....	38
Antecedentes.....	40
Hipótesis y Objetivos	43
Hipótesis de trabajo	44
Objetivo general	44
Objetivos específicos	44
CAPÍTULO 1.....	45
Aislamiento de hongos endófitos naturales del cultivo de tabaco en la Provincia de Jujuy, Argentina	45
Objetivo	46
Introducción	46
Materiales y Métodos.....	47
Colecta de las muestras.....	47
Aislamiento de los hongos endófitos.	48
Identificación morfológica de los hongos endófitos	49

Patrón de colonización y aislamiento de los hongos endófitos	51
Análisis de la diversidad del complejo fúngico.....	52
Resultados	53
Abundancia, diversidad, y tasas de colonización y aislamiento de los endófitos naturales	53
Análisis de diversidad	55
Discusión.....	59
CAPÍTULO 2.....	63
Aislamiento y caracterización de hongos entomopatógenos asociados al cultivo del tabaco en la Provincia de Jujuy, Argentina.	63
Objetivos.....	64
Introducción	64
Materiales y Métodos.....	67
Recolección de insectos y detección de infecciones	67
Recolección de muestras de suelo	68
Aislamiento de hongos entomopatógenos en laboratorio	69
Identificación de las especies fúngicas	70
Identificación morfológica.....	70
Identificación molecular	72
Patogenicidad de los aislamientos.	75
Resultados	78
Hongos entomopatógenos aislados	78
Caracterización morfológica.....	80
Caracterización molecular	95
Ensayo de patogenicidad.....	98
Discusión.....	101
CAPÍTULO 3.....	104
Capacidad endofítica de los hongos entomopatógenos	104
Objetivo	105
Introducción	105
Materiales y Métodos.....	108
Selección de cepas y preparación de inóculos	108
Plantas	109
Inoculación mediante la técnica de aspersión en hojas.....	110
Re-aislamiento del hongo.....	111

Análisis de los datos.....	112
Resultados	112
Discusión.....	123
CAPÍTULO 4.....	127
Preferencia alimenticia y efectos sub-letales de <i>Beauveria bassiana</i> como endófito sobre plagas del tabaco.	127
Objetivo	128
Introducción	128
Materiales y Métodos.....	132
Preparación del cultivo fúngico y obtención del cultivo	132
Insectos.....	133
Bioensayo 1: Efecto de <i>B. bassiana</i> como endófito sobre la preferencia alimenticia de las larvas de <i>H. gelotopoeon</i>	134
Bioensayo 2: Efecto de <i>B. bassiana</i> como endófito sobre la preferencia alimenticia de adultos de <i>D. speciosa</i>	135
Bioensayo 3: Efecto de <i>B. bassiana</i> como endófito sobre parámetros biológicos de <i>H. gelotopoeon</i> ..	136
Resultados	138
Bioensayo 1: Efecto de <i>B. bassiana</i> como endófito sobre la preferencia alimenticia de <i>H. gelotopoeon</i>	138
Bioensayo 2: Efecto de <i>B. bassiana</i> como endófito sobre la preferencia alimenticia de adultos de <i>D. speciosa</i>	139
Bioensayo 3: Efecto de <i>B. bassiana</i> como endófito sobre parámetros biológicos <i>H. gelotopoeon</i>	140
Discusión.....	143
Conclusiones.....	146
Perspectivas futuras	150
Referencias Bibliográficas.....	152

Resumen y Abstract



Resumen

Las plagas son las principales responsables de las mermas en los rendimientos de las cosechas, su control se realiza casi exclusivamente a través del control químico, mediante el empleo de insecticidas, fungicidas y herbicidas, prevaleciendo el uso de aquellos de amplio espectro (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides). Estos productos no sólo han contaminado las fuentes de agua y deteriorado la fertilidad de los suelos, sino también han afectado la fauna y la salud humana.

La provincia de Jujuy es una de las principales productoras de tabaco en el país y su cultivo reviste importancia desde el punto de vista socioeconómico y productivo, ya que es el cultivo con mayor rentabilidad. El tabaco es atacado por un variado número de organismos durante todo su ciclo, provocando como consecuencia la reducción de los rendimientos y de la calidad del producto cosechado. Entre los insectos plaga del tabaco pueden mencionarse los “Gusanos blancos” *Dyscinetus* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae), la “Vaquita de San Antonio” *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae), la “Pulguilla del tabaco” *Epitrix argentinensis* (Coleoptera: Chrysomelidae), “trips” *Frankliniella* spp. (Thysanoptera: Thripidae), los “pulgonos” *Myzus* spp. (Hemiptera: Aphididae), las “moscas blancas” *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), el “minador del tallo del tabaco” *Faustinus cubae* (Coleoptera: Curculionidae), el “complejo cogollero” integrado por lepidóteros del género *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) y la especie *Manduca sexta*.

Con el objetivo de mitigar los efectos adversos que devienen de la agricultura tradicional han surgido nuevos enfoques que permiten resolver los problemas de la producción agraria de una manera sostenible. Uno de ellos es el Manejo Integrado de Plagas (MIP), que es un sistema de protección vegetal que emplea diversas técnicas y que pretende ser persistente en el tiempo y justificable ambiental y económicamente. Una de las estrategias que emplea es el Control Biológico (CB), en dónde se utilizan organismos presentes naturalmente en el ambiente o no, para reducir la densidad poblacional de aquellos organismos considerados plaga. Los hongos entomopatógenos son agentes de CB eficaces por su alta especificidad, dispersión natural, posibilidad de cultivo *in vitro* manteniendo la patogenicidad, inocuidad para vertebrados y la posibilidad de provocar un control permanente una vez establecidos en el ambiente. A pesar de las ventajas mencionadas previamente, cuando se desea realizar un formulado con este tipo de microorganismos es importante tener en cuenta ciertos factores ambientales como la temperatura, humedad y exposición a la luz solar para garantizar el éxito de estos hongos.

El término “endófito” se utiliza para designar a aquellos organismos que habitan dentro de las plantas durante algún período de su ciclo de vida colonizando los tejidos internos de estas y sin

causarles daño aparente. Los hongos endófitos han sido aislados naturalmente de todas las plantas estudiadas hasta el momento y se han encontrado colonizando semillas, tallos, hojas entre otros órganos y tejidos vegetales.

La utilización de los hongos entomopatógenos como endófitos es una reciente herramienta que puede ofrecer oportunidades para mejorar la eficacia del control biológico ejercida por estos microorganismos como alternativa a las aplicaciones convencionales de micoinsecticidas. Los hongos *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokín, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams y *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) A.H.S. Br. & G. Sm. han sido aislados como endófitos de distintas especies de plantas, mientras que otros han sido inoculados artificialmente en plantas mediante diversas técnicas, con el objetivo final de controlar a distintas especies de insectos plagas que pudieran atacarlas.

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente expuestos el presente trabajo de Tesis Doctoral tuvo como objetivos: 1) caracterizar las comunidades de hongos endófitos presentes naturalmente en el cultivo de tabaco de la provincia de Jujuy, 2) realizar la prospección, detección y aislamiento de hongos entomopatógenos nativos en los insectos plaga y suelos del cultivo, 3) caracterizar las cepas aisladas morfológica y molecularmente, así como también por su capacidad biocida frente a plagas del cultivo de tabaco, 4) evaluar la capacidad endofítica de los hongos entomopatógenos aislados en condiciones de laboratorio mediante la técnica de aspersion foliar, y finalmente 5) evaluar la preferencia alimenticia, efectos sub-letales y patogenicidad sobre los insectos plaga del cultivo de tabaco, que se alimenten de plantas inoculadas con la cepa del hongo entomopatógeno con mejor capacidad endofítica.

Como resultado de los muestreos realizados en las fincas tabacaleras de la provincia de Jujuy, pudieron aislarse un total de 1588 cepas de hongos endófitos presentes naturalmente en plantas de tabaco Virginia (variedad K394) pertenecientes a los Phyla Ascomycota y Zygomycota. Estas fueron asignadas a 31 morfoespecies; 516 cepas fueron aisladas de las raíces, 504 de los tallos y 568 de las hojas. El análisis de componentes principales realizados permitió establecer que la mayoría de los aislamientos estuvieron presentes en un solo órgano.

A partir de muestras de suelo del cultivo de tabaco y aplicando la metodología de dilución seriada en medio selectivo, se aislaron 20 cepas de hongos entomopatógenos, de las cuales 11 correspondieron a la especie *B. bassiana*, 8 a *P. lilacinum* y 1 a *M. anisopliae*. El análisis de diversidad utilizando marcadores ISSR demostró que aquellas cepas de *B. bassiana* y *P. lilacinum* con mayor virulencia frente a las plagas *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) y *D. speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) generaban patrones de bandas similares.

Con el fin de evaluar la capacidad endofítica de las distintas cepas de hongos entomopatógenos se aplicaron mediante aspersión foliar soluciones de conidios a plantas de tabaco. Se calculó el porcentaje de colonización de las cepas sobre las raíces, tallos y hojas de las plantas a los 7, 14, 21 y 28 días postinoculación. La cepa de *B. bassiana* LPSc 1215, fue la que mayor capacidad endofítica mostró en los distintos órganos.

Los efectos de la cepa de *B. bassiana* LPSc 1215 como endófito sobre el consumo de adultos de *D. speciosa* y larvas de *H. gelotopoeon*, obtenidos del campo y criados con dieta artificial en laboratorio respectivamente, se analizó mediante “choice test”. Esta cepa no logró reducir significativamente la cantidad de tejido vegetal consumido por los insectos. Por otra parte, se evaluaron efectos letales y sub-letales del mismo entomopatógeno como endófito sobre *H. gelotopoeon*. La supervivencia, fertilidad y longevidad larval del insecto se vieron negativamente afectadas por la presencia del endófito, mientras que en los adultos afectó negativamente el tiempo generacional, el período de oviposición, la fecundidad y la fertilidad de los huevos.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral permiten concluir que el aislamiento nativo LPSc 1215 de *B. bassiana* obtenido a partir de muestras de suelo del cultivo de tabaco de la provincia de Jujuy, podría ser incorporado, a través de su colonización endofítica, como agente de control del lepidóptero plaga *H. gelotopoeon* en programas de protección vegetal.

Abstract

Insect pests are the main responsible for the decline in crop yields, their control is carried out through chemical control, employing insecticides, fungicides and herbicides, prevailing the use of broad spectre insecticides (organochlorines, organophosphorus, carbamates and pyrethroids). These products have polluted water sources and impaired soil fertility, and have affected wildlife and human health as well.

Jujuy province is one of the main tobacco producer in Argentina and its growth becomes relevant from a socio-economic and productive point of view since it is the most profitable crop in the region. Many organisms attack the tobacco crop during its cycle, causing losses in yield and quality of the harvested product. Among insect pests “White worms” *Dyscinetus* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae), “Cucurbit beetle” *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae), “Tobacco flea” *Epitrix argentinensis* (Coleoptera: Chrysomelidae), “Trips” *Frankliniella* spp. (Thysanoptera: Thripidae), “Aphids” *Myzus* spp (Hemiptera: Aphididae), “Whiteflies” *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), “Tobacco stem miner” *Faustinus cubae* (Coleoptera: Curculionidae), “Bollworm complex” which comprises species from the genus *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Manduca sexta* are found.

To mitigate the adverse effects produced by traditional agriculture in sustainable manner new approaches had been developed. In this sense, Integrated Pest Management (IPM) constitutes a crop protection system which combines several techniques and that intends to be a long-term strategy and environmental and economically viable. Biological Control (BC) is one of the strategies that IPM programs employ, and utilizes organisms that are naturally present in the environment or not, to reduce plagues density. Entomopathogenic fungi are considered effective BC agents since they are highly specific to insect, disperse naturally, could be *in vitro* maintained, are not toxic to vertebrates and they could establish in the environment providing a permanent control over pests. Despite previous mentioned facts, when entomopathogenic fungi are utilized under field conditions certain environmental conditions like temperature, humidity and sunlight exposure may affect their effectiveness.

The term “endophyte” is utilized to refer to those organisms that inhabit plant tissues during a period of their life cycle without causing apparent harm to their host. Endophytic fungi have been isolated from almost every plant studied and have been found colonizing seeds, stems, leaves and other vegetal tissues and organs.

A recent developed tool to improve the effectiveness of the BC exerted by these organisms is the utilization of entomopathogenic fungi as endophytes. *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.,

Metarhizium anisopliae (Metschn.) Sorokīn, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams and *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) A.H.S. Br. & G. Sm have been isolated as natural endophytes of different plant species, while others have been artificially inoculated utilizing different techniques to control insect pests.

In agreement with previously mentioned facts, this Doctoral Thesis aimed: 1) to describe natural endophytic communities in *Nicotiana tabacum* L. plants in Jujuy province, 2) to prospect, detect and isolate native strains of entomopathogenic fungi present in soils and infecting insects, 3) to perform a morphological and molecular description of the strains and their insecticidal capacity to tobacco plagues as well, 4) to evaluate the obtained strains of entomopathogenic fungi capacity to endophytically colonize tobacco plants under laboratory conditions and finally 5) to evaluate feeding deterrence, sub-lethal effects and pathogenicity towards insects fed with plants inoculated with the strain that showed the best endophytic capacity.

From sampling performed in Jujuy province, a total of 1588 endophytic fungal strains were isolated from Virginia tobacco plants (variety K394), belonging to the Phyla Ascomycota and Zygomycota. These were assigned to 31 morphospecies; 516 strains were isolated from roots, 504 from stems and 568 from leaves. The Principal Component Analysis performed allowed to establish that most of the isolates were present in only one organ.

On the other hand, 20 entomopathogenic fungal strains, 11 belonging to *B. bassiana*, 8 to *P. lilacinum* and 1 to *M. anisopliae* were isolated from soil samples employing the serial dilution technique in selective media. The diversity analysis using ISSR markers showed that *B. bassiana* and *P. lilacinum* strains that presented higher pathogenicity towards *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) and *D. speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) generated similar band patterns.

To evaluate the endophytic capacity of the entomopathogenic fungal strains the foliar spray method was utilized to spray conidial solutions to tobacco plants. The colonization percentage was determined on roots, stems and leaves at 7, 14, 21 and 28 days after inoculation. The *B. bassiana* LPSC 1215 strain showed the best endophytic capacity among the three organs evaluated.

A “choice test” was performed to study the effects of *B. bassiana* LPSc 1215 as endophyte over feeding deterrence against *D. speciosa* adults and *H. gelotopoeon* larvae that were obtained from the field and raised on artificial diet respectively. This strain did not reduced significantly the amount of vegetal material consumed by the insects. The lethal and sub-lethal effects of this strain as endophyte over *H. gelotopoeon* were also studied. Survival, fertility and larval longevity were negatively affected by the presence of the endophyte, while in adults the generational time, ovipositional period, fecundity and fertility were negatively affected as well.

Results obtained in the present Doctoral Thesis allow concluding that the native strain of *B. bassiana* LPSc 1215 obtained from tobacco grown soil from Jujuy province, could be incorporated as an endophytic control agent for the lepidopteran plague *H. gelotopoeon* in crop protection programs.

Introducción



El cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

Nicotiana tabacum L. (Solanales: Solanaceae) es una planta herbácea originaria de América tropical, que en la actualidad se cultiva en todo el mundo y es la principal fuente comercial del tabaco (Figura 1). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2018 estima que alrededor de un billón de personas en el mundo fuman tabaco (14% de la población mundial) haciendo de este un importante cultivo en muchas regiones.



Figura 1: Planta de tabaco *Nicotiana tabacum* L. (http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/thome/band4/tafel_033_small.jpg)

El tabaco es una planta anual (sólo en algunas variedades perenne) que puede alcanzar 1 a 3 metros de altura. Posee hojas lanceoladas, alternadas en espiral alrededor del tallo, que son de gran tamaño (0,6 a 1 m de largo y 0,3 a 0,5 m de ancho). Las flores son tubulares, varían en color desde el blanco al rosa hasta el rojizo, crecen en grupos terminales (inflorescencias) ramificados con flores individuales de 3,5 a 5 cm de largo. En el cultivo comercial del tabaco las flores son removidas para promover el mayor desarrollo de las hojas. Los frutos son cápsulas elípticas que contienen pequeñas y numerosas semillas amarronadas (aproximadamente de 0,5 mm de diámetro).

La producción del tabaco.

Según estimaciones de la FAO, la producción comercial mundial de tabaco en 2010 fue de 7,1 millones de toneladas abarcando una superficie sembrada de 40 millones de hectáreas. Los principales países productores de tabaco son China (43%), Brasil (12%) e India (9%) que en conjunto representaron para ese mismo año el 63% del total de la producción mundial de tabaco siguen, EE.UU, Malawi, Indonesia, Argentina e Italia con porcentajes que varían entre el 5% y el 2%. De acuerdo con los datos de la FAO, Argentina produjo en el año 2009, 159.495 toneladas de tabaco.

El mercado del tabaco en el mundo ha tenido una expansión significativa desde sus comienzos; además la cosecha reviste una importancia económica considerable, sobre todo en países en desarrollo dado que se utiliza una gran cantidad de mano de obra, principalmente durante ese periodo, ya que se realiza de manera artesanal empleando una gran cantidad de personas. En cuanto a las variedades de tabaco, el Virginia (Flue Cured Virginia Tobacco -FCV) es la variedad más importante y se produce en todos los principales países productores de tabaco; le sigue el Burley, también producido en gran medida, y por último el Oriental que se cultiva principalmente en Turquía (Ledesma & Drenaje 2012).

El tabaquismo está asociado con varios tipos de enfermedades, que eventualmente llevan a provocar la muerte de los fumadores. Aquellas que tienen mayor incidencia en la población en general son distintos tipos de cánceres y particularmente el cáncer de pulmón, enfermedades cardiovasculares y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Gonzalez-Rozada 2006). A pesar de las consecuencias nocivas asociadas al consumo de tabaco, la tendencia mundial general es hacia un aumento en el consumo en los próximos años (www.agroindustria.gob.ar).

Argentina produce el 1,8% de la producción mundial de tabaco. Este cultivo se desarrolla en las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Chaco, Catamarca, Misiones y Corrientes, (Figura 2) en las cuales se han realizado grandes inversiones para mantener esta actividad y en la que participan más de 17.000 productores que emplean unas 50.000 personas en su producción primaria. En total, unas 500.000 personas dependen directa o indirectamente del cultivo de tabaco, debido a la gran demanda de mano de obra que genera (Gonzales Rozada 2006).

La historia del cultivo de tabaco en el mundo se remonta a etapas coloniales (Siglos XV y XVI), cuando era principalmente utilizado por pueblos indígenas en América del Norte y del Sur. En Argentina, durante los años 1935 a 1955 se incrementó la producción en las provincias de Salta y Jujuy, principalmente de las variedades Virginia, Burley y Criollo Salteño. A partir de la sanción de la Ley 19.800 del año 1972, se crea el actual Fondo Especial del Tabaco (FET), por medio del

cual se les brinda a los productores una participación en la venta del producto final de la materia prima que ellos mismos generan (Corradini et al. 2003).

En este país, desde el punto vista geográfico, la superficie plantada y la producción de tabaco están concentradas en las regiones del Noroeste (NOA) y Noreste (NEA), las cuales presentan diferentes características en los que respecta a dimensión de las explotaciones, tecnificación e inversión (Figura 2). Mientras en las provincias del NOA la producción está en manos de agricultores altamente tecnificados, en el NEA la mayoría de los productores son minifundistas, usando mano de obra familiar y en superficies que en algunos casos no superan las 2 hectáreas en algunos casos. En las provincias de Jujuy y Salta, la producción de tabaco está concentrada en grandes explotaciones, que cuentan con una superficie de más de 30 hectáreas destinada al cultivo (Cámara del Tabaco de Jujuy, 2008).

El cultivo de tabaco tiene una gran importancia económica a nivel regional (particularmente en las provincias de Jujuy, Salta y Misiones que concentran el 93% de la producción del país) por su aporte al PBI de estas provincias, a las exportaciones y el ingreso de divisas y por su relevancia en el empleo provincial. Desde el punto de vista socioeconómico y productivo, al igual que lo que sucede en el resto de los países productores, es el cultivo con mayor rentabilidad en las explotaciones de pequeña escala y en zonas donde otros cultivos no resultan viables o bien no son tan rentables. Otro aspecto de suma importancia es que el cultivo de tabaco tiene arraigo histórico, transmitiéndose de generación en generación dentro del núcleo familiar, así cultivar tabaco simboliza una forma de vida, y en muchos casos, una forma de subsistencia (Corradini et al. 2005).

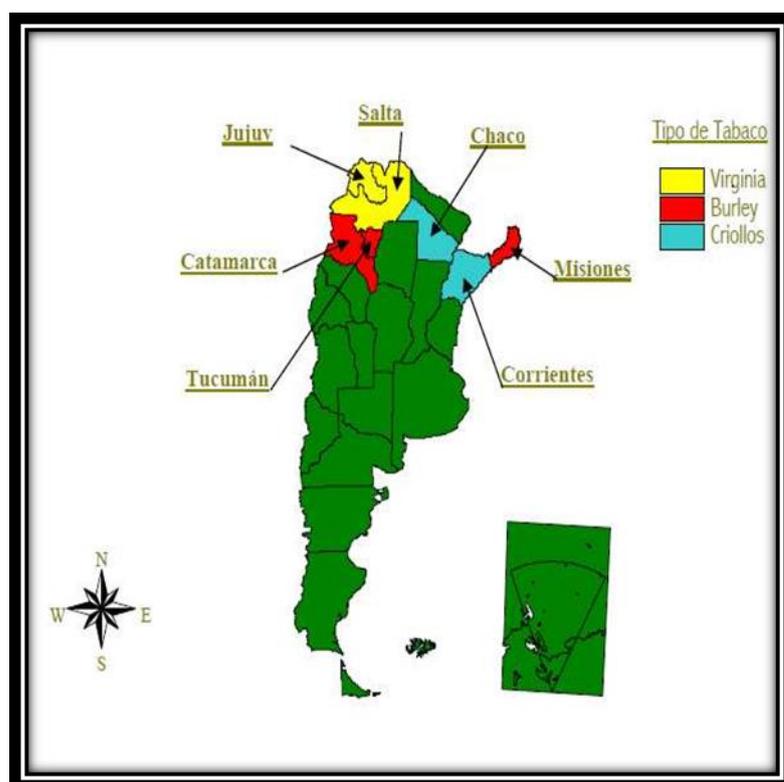


Figura 2: Provincias argentinas en las que se cultivan las distintas variedades de tabaco (Ledesma & Drenaje 2012).

De acuerdo a datos relevados durante la campaña 2009/2010 el 15 % de los puestos de trabajo fueron generados por la agricultura, silvicultura y pesca a nivel nacional, el 2,2 % de los puestos de trabajo fueron generados por el sector privado y el 1,9 % de la ocupación total correspondieron a los generados por el cultivo de tabaco. Este cultivo generó el 5,8% de la ocupación privada en la provincia de Misiones y el 5,1 % de la ocupación total, mientras que en Jujuy dichas cifras fueron del 5,0 % y 4,3 %, respectivamente. La importancia del tabaco como actividad generadora de ocupación también es muy alta en Salta y Catamarca (Corradini et al. 2005).

Como ya se mencionó, las provincias de Jujuy y Salta son las más importantes en cuanto a producción de tabaco en el país. El sector está organizado a través de entidades como la Cooperativa tabacalera y la Cámara tabacalera, que están bien consolidadas y articuladas para ofrecer al productor asistencia gremial, comercial, técnica y social. A diferencia de otras provincias, los productores son medianos y grandes en su mayoría, con gran conocimiento del negocio y autónomos en cuanto a su producción y comercialización (Corradini et al. 2005).

Se considera que las expectativas para el futuro del sector son positivas y que el potencial crecimiento estará en las exportaciones. Sus principales problemas productivos, al igual que en

otros cultivos, son los costos de la mano de obra, los insumos y las pérdidas ocasionadas por el ataque de distintas especies de insectos plagas.

Etapas en la producción.

El proceso de producción implica cuatro etapas principales que son desarrolladas por los productores: almácigo, plantación, cosecha-secado y curado:

-La etapa de almácigo (julio-agosto), incluye diversas tareas, entre las cuales se encuentra la preparación de la tierra bajo tratamientos necesarios para prevenir malezas, hongos e insectos y la fertilización. La siembra requiere de cuidados respecto de la distribución de la semilla para su correcto crecimiento. Luego de 70 días posteriores a la siembra, las plantas ya están listas para ser trasplantadas.

-La etapa de la plantación (septiembre a octubre), también implica una preparación del terreno, para controlar las malezas y se fertiliza. El control de malezas se puede realizar en forma mecánica o manual, empleándose gran cantidad de agroquímicos (por ejemplo Clomazone, Pendimetalín y S-metolaclor). Para el trasplante se utiliza un “hoyador” para acomodar las plantas en el surco y evitar la mala distribución de las raíces. Después de 7 a 10 días, una vez que las plantas se han arraigado, se inician los trabajos de cultivo: la carpida, el aporque del suelo, el desflore y el desbrote. Estas tareas ayudan a desarrollar mejor la planta y aumentan los rendimientos por hectárea.

-La tercera etapa es la cosecha (diciembre-febrero), que se lleva a cabo cuando las hojas se encuentran maduras, aproximadamente 90-100 días posteriores a la plantación en campo. La recolección de las mismas se realiza manualmente y el corte empieza por aquellas que se encuentran en la base de la planta. En cada corte se recogen de 3 a 4 hojas, con una periodicidad de 8 a 10 días.

Durante todo el ciclo de desarrollo del cultivo, se realizan tratamientos con insecticidas químicos para controlar la aparición de insectos que afectan a la hoja.

Por último se procede al curado y secado del tabaco, que se inicia a fines de enero y culmina en marzo. Los sistemas de curado son distintos según las variedades.

El ciclo completo del cultivo de tabaco es de 330 días.

Manejo de Productos Fitosanitarios

La utilización de agroquímicos en Argentina está regulada dentro de un marco que incluye normas nacionales e internacionales. Desde la óptica internacional, tanto la FAO como la OMS incluyen estándares o códigos de buenas prácticas que resultan claros indicadores de las medidas a seguir a efectos de la sustentabilidad de la producción. Entre estos cabe mencionar por ejemplo el Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas; el Manual sobre elaboración y empleo de las especificaciones de la FAO y de la OMS para plaguicidas y, la Guía sobre Buenas Prácticas para la Aplicación Aérea de Plaguicidas o el Glosario sobre Estándares Regionales Fitosanitarios (COSAVE). Estos códigos o manuales de conducta requieren de la acción voluntaria de las partes frente a ciertas actividades que no se encuentran reguladas. En Argentina, el uso y comercialización de pesticidas se encuentra regulado por Decretos y Resoluciones del Poder Ejecutivo y sus órganos de administración, pero siguen siendo las Convenciones Internacionales ya ratificadas los instrumentos que obligan al Estado a cumplir determinadas metas o restricciones impuestas en forma multilateral.

Además, existe en Argentina un Programa de Reconversión de Áreas Tabacaleras que se encuentra trabajando en programas de diversificación, que le permitan a la industria seguir adelante, mediante capacitaciones del sector, opciones de sustitución y mitigación, y provisión de insumos. A partir de planes de diversificación, las cuestiones ligadas a la protección ambiental, mediante introducción de tecnologías limpias permitirán continuar en el avance hacia un modelo sustentable del cultivo (Corradini et al. 2005).

En base a la Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina (CASAFE) del año 2013-2015 los productos utilizados en la actividad tabacalera que actúan como herbicidas, insecticidas, fungicidas u otros son: entre los herbicidas, clomazone, napropamida, trifluralina, pendimetalin, metacloro, setoxidim. Entre los insecticidas pueden mencionarse al etoprop, fenamifos, aldicarb, carbofuran, DDPV, endosulfan, metamidofos, metidation, metomil, carbaryl, clorpirifos, deltametrina, dimetoato, fosmet, imidacloprid, acefato, mancozeb, tiametoxam, *Bacillus thuringiensis*, y metaxifenocide. Por otra parte, como fungicidas se incluyen a: metalaxil, mancozeb más cobre, maneb más zinc, captan, carbendazin, ferbam, mancozeb, zineb. A pesar de la existencia de programas que proponen erradicar la utilización de bromuro de metilo para la desinfección de los almácigos en tabaco, la práctica continúa con las consecuencias que trae aparejada la utilización de este químico (Mussi 2018).

La generalización en el uso de agroquímicos para todas las etapas del cultivo responde a la necesidad de incrementar los rendimientos por hectárea, y a compensar el desgaste y pérdida de

productividad de la tierra y mejorar la calidad de la hoja. Esta práctica se repite año tras año sin los medios de protección para los encargados de realizarlas ya que las pulverizaciones se hacen con mochilas de carga líquida sin la utilización de máscaras, vestimenta impermeable, botas de goma, etc. En cuanto a las consecuencias sobre la salud humana se han reportado aumentos en los casos de recién nacidos con mielomeningocele, una malformación del sistema nervioso central, también casos de leucemia, linfomas y otras enfermedades vinculadas a la exposición y manipulación directa de los agroquímicos empleados en la actividad y como resultado de la contaminación del medio ambiente (suelo, aguas superficiales y subterráneas) (Paez 2018). En cuanto a las consecuencias sobre el medio ambiente, particularmente en el aire lo que ocurre es que la combinación de los productos tóxicos con la humedad aérea crean una atmósfera en la que se incorporan partículas nocivas que favorecen el desarrollo de enfermedades respiratorias. Por otro lado en el suelo, la incorporación excesiva de agrotóxicos lo tornan estéril, ya que los microorganismos que en él habitan se ven afectados y esto conlleva a que los procesos de conservación, fijación y asimilación de nutrientes cesen (Paez 2018).

Principales plagas

El tabaco es atacado por un variado número de enfermedades y plagas durante todo su ciclo, desde el trasplante hasta la cosecha de la última hoja, ocasionando como consecuencia la reducción de los rendimientos y desmejorando la calidad del producto cosechado.

Los insectos pueden clasificarse según la región de la planta que afecten, por ejemplo el “Complejo de gusanos del suelo” comprende insectos en estadio larval que afectan los sistemas radiculares de la planta. Se trata de un conjunto de coleópteros y lepidópteros dentro de los que se encuentran: “Gusanos cortadores o grasientos” *Agrotis ypsilon* (Lepidoptera: Noctuidae), “Gusanos alambres” *Conoderus* spp. (Coleoptera: Elateridae) y “Gusanos blancos” *Dyscinetus* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae). Entre los insectos que afectan el follaje pueden mencionarse la “Vaquita de San Antonio” *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae), la “Pulguilla del tabaco” *Epitrix argentinensis* (Coleoptera: Chrysomelidae), “trips” *Frankliniella* spp. (Thysanoptera: Thripidae), “pulgonos” *Myzus* spp. (Hemiptera: Aphididae), “moscas blancas” *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) y el “minador del tallo del tabaco” *Faustinus cubae* (Coleoptera: Curculionidae). Por otro lado, el cogollo de las plantas es atacado por el “complejo cogollero” integrado por lepidópteros del género *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) y la especie *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) (Mercado Cárdenas et al. 2013).

Además de los insectos, otros invertebrados que también causan importantes daños al cultivo son los ácaros, como la “arañuela roja” *Tetranychus urticae* y nematodos formadores de agallas, lesionantes y formadores de quistes (Mercado Cárdenas et al. 2013).

Manejo de artrópodos

En el NOA existen numerosas recomendaciones sobre el uso de distintos agentes de protección. Estas generalmente son brindadas por las empresas fabricantes de los agentes de protección o por experiencias en el extranjero y no son corroboradas a campo ni por instituciones oficiales, educacionales, gremiales, acopiadoras ni por los propios productores. De igual manera, no existen trabajos específicos que determinen los momentos oportunos de tratamientos y/o Umbrales de Daños Económicos, por lo que se adoptan las mismas recomendaciones que las que se realizan en otros países (Massalin Particulares 2011).

En base a plagas presentes en el cultivo de tabaco, las aplicaciones se dividen habitualmente en dos tipos, según las características y el objetivo de las mismas. Se distinguen los Tratamientos Base, los cuales se realizan luego de efectuado el trasplante e incluso durante el mismo trasplante o como última labor de almácigo 24 – 48 horas antes de trasplantar y con el objetivo primario de controlar al Gusano Minador *F. cubae*. Por otro lado, las Aplicaciones Foliares tienen como objetivo controlar gusanos del “complejo cogollero” (*Helicoverpa* sp.), Moscas blancas (*Bemisia* spp.), Pulguillas (*Epitrix* spp.), Vaquitas (*D. speciosa*), Arañuela roja (*T. urticae*), varias especies de trips y otras plagas eventuales. El número de aplicaciones es variable y van desde un mínimo de 2-3 hasta 7 por ciclo de cultivo y según la zona y problemática fitosanitaria (Delgado & Fedre 2003).

Manejo Integrado de Plagas (MIP)

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define al Manejo Integrado de Plagas (MIP) como “un sistema de manejo de poblaciones de plagas que emplea todas las técnicas apropiadas de manera compatible para reducir las poblaciones de las plagas y mantenerlas a niveles debajo de aquellos en los que se produce daño económico” (Smith & Reynolds 1966).

El MIP es un sistema de protección vegetal que pretende ser persistente en el tiempo, justificable ambiental y económicamente, en el que el daño causado por plagas, enfermedades o malezas es mitigado mediante el empleo de factores que limitan el crecimiento de las poblaciones

de estos organismos, y cuyas técnicas se complementan (Van Lenteren 1993). El MIP implica que, previo a tomar cualquier decisión, se estudien cuales son los mecanismos de regulación de plagas e interacciones entre los componentes del sistema que se dan naturalmente en el ambiente previo a la introducción de elementos ajenos al ecosistema como son los insecticidas sintéticos (Van Lenteren 2014).

El siglo pasado se caracterizó por el surgimiento de grandes transformaciones en la agricultura. Dentro de ellos se destacan: la mecanización, el uso de agroquímicos (plaguicidas, fertilizantes, hormonas de crecimiento), la selección de las variedades de alto potencial productivo y otros avances biotecnológicos. El efecto positivo de las nuevas tecnologías sobre el crecimiento de la productividad agrícola es innegable, pero la forma en que se logró ese desarrollo no es sostenible (Perez Consuegra 2010).

La pérdida de la diversidad biológica es uno de los resultados negativos, de consecuencias impredecibles para el mantenimiento de la vida en la Tierra. Una de las principales causas es el monocultivo que genera además el excesivo uso de fertilizantes inorgánicos y de plaguicidas de síntesis química. La mecanización excesiva y el laboreo intensivo del suelo, unidos a la fertilización inorgánica indiscriminada y a los sistemas intensivos de riego, traen como consecuencia la modificación de las propiedades del suelo y contribuyen a la salinización, acidificación, erosión, compactación y disminución del contenido de materia orgánica, y como consecuencia la desertificación y la pérdida de tierras aptas para la agricultura (Van Lenteren 2014).

Pero más importante aún es el uso indiscriminado de plaguicidas debido a que es la causa directa de la aparición del fenómeno de la resistencia de diferentes organismos, y por consiguiente de la pérdida de su efectividad. Ante esta situación, es común que los agricultores aumenten las dosis y preparen mezclas de varios plaguicidas, con frecuencia más tóxicos, por lo que el problema de la resistencia, lejos de solucionarse, se agrava. Las prácticas de protección vegetal que se basan en el control químico producen otros efectos como brotes de plagas secundarias, resurgencia de plagas y disminución de las poblaciones de enemigos naturales. Los productos químicos que se aplican en los sistemas agrícolas industriales no sólo han contaminado las fuentes de agua y deteriorado la fertilidad de los suelos, sino también han afectado la fauna y la salud humana (Gonzalez et al. 2010).

La necesidad de mitigar los numerosos efectos adversos que devienen de la agricultura tradicional ha dado lugar al surgimiento y desarrollo de nuevos enfoques que permitirán resolver los problemas de la producción agraria de una forma sostenible, de modo de garantizar su desarrollo presente y futuro. Para ello la combinación de estrategias dentro del marco de programas de MIP

para reducir o eliminar los efectos negativos causados por el control tradicional de plagas sería la única solución a largo plazo para la protección vegetal.

Control Biológico (CB)

El Control Biológico (CB) es definido por Van Lenteren (2014) como: “la utilización de un organismo para reducir la densidad poblacional de otro organismo”. El CB está presente en todos los ecosistemas y es la manera en que se regulan las poblaciones naturalmente. Involucra el uso de poblaciones de enemigos naturales para reducir poblaciones de plagas a densidades menores, ya sea temporal o permanentemente (Van Driesche et al. 2007).

El CB puede ser empleado mediante distintas estrategias como la conservación de enemigos naturales, la liberación de enemigos naturales criados comercialmente, y la utilización de plaguicidas microbiológicos. Estas modalidades pueden suprimir temporalmente plagas de cultivos, ya sean nativas o invasoras en un espacio limitado.

Van Lenteren (2014) establece que el MIP en la actualidad depende particularmente del CB dado que es el método de control de plagas más sustentable, económico y ambientalmente seguro. Además confiere importantes ventajas para los agricultores y consumidores, por esto se espera que el CB constituya el 35-40% de los métodos de protección vegetal para el año 2050.

Entre las ventajas que el CB confiere a los agricultores pueden mencionarse las siguientes: se reduce la exposición a los insecticidas; se evitan los residuos que estos productos generan, no se observan los efectos fitotóxicos en plantines y tampoco el aborto prematuro de flores y frutos (cómo resultado el rendimiento se ve incrementado) (Van Lenteren 2014).

Una de las estrategias dentro del CB es la utilización de patógenos de artrópodos, estos microorganismos incluyen bacterias, virus, hongos, nematodos y protozoos. Algunos de ellos son parte del control que ocurre espontáneamente en la naturaleza causando epizootias como, por ejemplo, las causadas por el hongo *Entomophaga maimaga* Humber, Shimazu, and R. S. Soper que periódicamente reduce las poblaciones de las larvas de la polilla *Lymantria dispar* (L.) en Norteamérica o las provocadas por *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson que también afectan las poblaciones de insectos defoliadores especialmente las de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Van Driesche et al. 2007).

El uso de patógenos para el CB ha sido principalmente enfocado en formular microorganismos para aplicación como bioplaguicidas (Bateman 2004). Particularmente, los hongos entomopatógenos son importantes dentro de los programas de MIP ya que muchas especies

han sido aprovechadas comercialmente y se han desarrollado en base a ellas unos 170 productos comerciales para combatir plagas en distintos países (de Faria & Wraight 2007).

Hongos entomopatógenos

El Reino Fungi es uno de los grupos más grandes de microorganismos eucariotas presentes en los ecosistemas terrestres. Se han descrito unas 110.000 especies aproximadamente, aunque se cree que estas sólo representan una fracción de su diversidad que comprendería unas 1,5 a 5 millones de especies (Blackwell 2011; Araújo & Hughes 2016).

Los organismos en los ecosistemas terrestres dependen de la presencia de los hongos, estos juegan un rol esencial en el mantenimiento del equilibrio ecológico. Cabe destacar además, que los hongos tienden a desarrollar íntimas relaciones con otros grupos de organismos. Las relaciones entre insectos y muchos grupos de hongos, varían desde mutualistas (endosimbiontes que ayudan a la digestión), a ser utilizados como alimento (que los insectos cultivan), hasta parásitos y comensales transmitidos sexualmente y patógenos. Sin embargo, el estudio de las interacciones entre insectos-hongos permanece como uno de los campos de la diversidad fúngica menos estudiados (Vega & Blackwell 2005).

Por otro lado, los hongos patógenos de insectos han evolucionado en la mayoría de los grandes linajes de hongos (Figura 3) (con algunas pocas excepciones como los Glomeromycota, que contienen sólo clados de micorrizas).

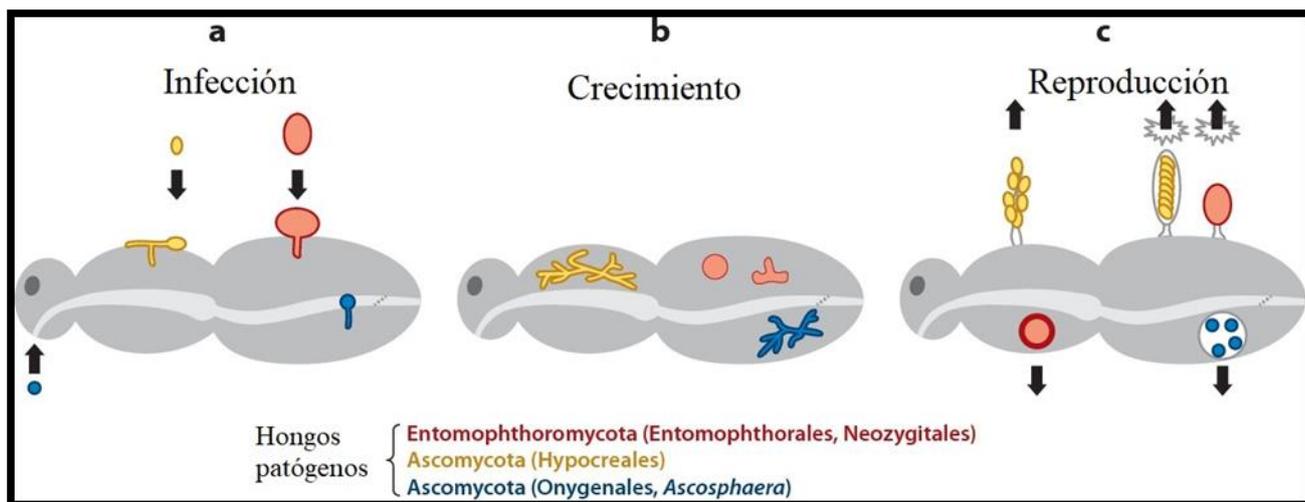


Figura 3 Hongos entomopatógenos y mecanismos de **a**-infección, **b**-crecimiento y **c**-reproducción (modificado de Boomsma et al. 2014)

A través de los registros fósiles y los datos moleculares se estima que los hongos han evolucionado por unos 0,5 –1,5 millones de años (m.a.), sin embargo se estima que los Ascomycota y Basidiomycota surgieron recién en el Devónico, hace 400 m.a. El fósil más antiguo conocido de hongo entomopatógenos es el de un organismo similar a *Ophiocordyceps* infectando a una cochinilla (Hemiptera) que data de 100 a 110 m.a de antigüedad, otros fósiles algo más recientes incluyen a patógenos de termitas (Isoptera) infectados por hongos similares a *Entomophthora* y el de una hormiga (Hymenoptera) infectada por un hongo similar a *Beauveria*, ambos datados en 20- 30 m.a. (Boomsma et al. 2014).

Existen registros del reconocimiento de enfermedades causadas por patógenos desde las épocas de romanos y griegos. También en el siglo XVIII fueron registradas en China enfermedades presentes en los gusanos de seda, que llamaban la atención debido a la importancia de estos insectos en la industria de la seda de la época. Aunque fue Vallisnieri en el año 1706, el primero en reconocer la patología causada en estos insectos; más adelante en 1726, De Reamur realizó la primera publicación en la que se describe e ilustra un ejemplar de *Cordyceps* infectando una larva de noctuido. A pesar de ser registradas las patologías, la naturaleza de los microorganismos que las causaban aun no había sido dilucidada. Agostino Bassi (1773-1856) es considerado el padre de la patología de insectos dado que fue el primero en demostrar experimentalmente en el año 1835 que un microorganismo (posteriormente denominado *Beauveria bassiana*) causaba infecciones en los gusanos de seda y otros insectos. Fue también Bassi en el año 1836, quién publicó la idea sobre la posible utilización de estos microorganismos en el control de plagas. Unos años más adelante, en 1879, los estudios de Metchnikoff utilizando el hongo *Metarhizium anisopliae* para controlar al escarabajo *Anisoplia austriaca* (una plaga importante de los cereales en Odessa, Rusia) concluyeron que el hongo al ser producido en masa e introducido de manera adecuada en el campo, provocaba un control efectivo de la plaga. Estos resultados llevaron a que este hongo fuera producido en masa en 1884 en Ucrania, para ser testado en el campo para combatir el insecto plaga que atacaba los cultivos de cereales. Desde épocas tan remotas la naturaleza entomopatógena de estos microorganismos ha sido reconocida y aprovechada por el hombre.

El Phylum comprende desde grupos pequeños de patógenos de insectos dentro de los Pleosporales, Myriangiales y Ascospaerales hasta grandes grupos de entomopatógenos que son los Hypocreales (Samson et al. 1998).

Los Pleosporales, incluyen especies entomopatógenas pertenecientes al género *Podonectria* (Petch 1921), que infectan cochinillas cubriendo completamente el cuerpo del insecto presentando un micelio de aspecto algodonoso en el que se desarrollan peritecios y posteriormente esporas multiseptadas (Kobayasi & Shimizu 1977). El género es cosmopolita se encuentra frecuentemente

en climas cálidos (Petch 1921), las formas anamorfas a los que se lo ha relacionado son *Tetracrium* (Petch 1921; Kobayasi & Shimizu 1977) (que forma esporodoquios) y *Tetranacrium* (Rossman 1978; Roberts & Humber 1981) (que forma picnidios).

El orden Myriangiales, incluye especies entomopatógenas de cochinillas que cubren y penetran con el micelio a sus huéspedes, incluso pueden encontrarse varias cochinillas debajo del estroma (Miller 1940). El crecimiento ocurre cuando llueve, las partes vivas del hongo aumentan su diámetro, producen ascocarpos con ascosporas que son las estructuras infectivas, ya que no existen registros de la formación de conidios (Miller 1940).

El género *Ascospaera* es un grupo particular que se encuentra representado por aproximadamente 26 especies patógenas de abejas. Estas especies son casi exclusivamente saprótrofas de miel, cocones, heces larvales o materiales con los que las abejas construyen el nido como hojas, barro o cera (Wynns et al. 2012). Además algunas especies son agentes de dispersión de enfermedades fúngicas, atacando las crías de numerosas especies de abejas sociales y solitarias (Klinger et al. 2013). La infección ocurre cuando la larva ingiere las esporas fúngicas que una vez que germinan en el tubo digestivo invaden todo el cuerpo, formando luego nuevas esporas que emergen sobre la cutícula de las larvas muertas (Vojvodic et al. 2012).

Cada grupo de entomopatógenos ha desarrollado a lo largo de su historia evolutiva estrategias y morfologías particulares que los hacen patógenos extremadamente eficientes. Se estima que unas 750 especies de hongos son patógenas de insectos y están distribuidas en 90 géneros. A su vez de éstas, sólo 20 especies (distribuidas en 12 géneros) son las que han sido mayormente estudiadas: *Lagenidium* (considerado ahora no un hongo verdadero sino un miembro del Reino Straminipila), *Entomophaga*, *Neozygites*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Aschersonia*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Beauveria* y *Paecilomyces* (hongos verdaderos, del Reino Eumycota) (de Faria & Wraight 2007).

Desde el punto de vista del control de plagas agrícolas, el Phylum Ascomycota es el que reviste mayor importancia, ya que agrupa a la mayoría de hongos patógenos de insectos (Humber 2012). El Phylum Ascomycota es el más diverso dentro del reino de los hongos, con formas ecológicamente diversas como descomponedores, simbiontes (como endófitos y líquenes), patógenos de plantas, humanos y de insectos. Sus representantes se caracterizan por presentar hifas septadas regularmente. Además, los teleomorfos forman esporas sexuales, de origen meiótico (ascosporas) en ascos (estructuras con forma de saco) y que se liberan al ambiente de manera activa. Sin embargo, estos hongos se encuentran en la naturaleza mayoritariamente en su estado asexual (anamorfo), en el que las hifas se diferencian en conidióforos, células conidiógenas o fiálides y conidios los cuales corresponden a las estructuras reproductivas asexuales de origen mitótico. La

producción de los conidios ocurre en las células conidiógenas erectas del micelio aéreo y la dispersión de éstos es de manera pasiva (Roberts & Humber 1981).

Los Hypocreales son el orden de Ascomycota que mayor número de especies entomopatógenas incluye, por ejemplo se encuentran los géneros *Hypocrella*, *Cordyceps*, *Ophiocordyceps*, *Moelleriella* entre otros, que se relacionan con los anamorfos de los géneros *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Hymenostilbe*, *Akanthomyces* (Roberts & Humber 1981). La secuenciación de ADN ha permitido asociar anamorfos y teleomorfos, que son genéticamente idénticos pero fenotípicamente distintos. Estos hallazgos han permitido revelar una gran plasticidad fenotípica en la morfología de los hongos y se ha podido establecer que los anamorfos *Beauveria* y *Lecanicillium* pertenecen al mismo linaje que los teleomorfos del género *Cordyceps*, que los anamorfos del género *Metarhizium* son consistentes con los teleomorfos *Metacordyceps* y el anamorfo *Hirsutella* corresponden con los teleomorfos *Ophiocordyceps* (Vega et al. 2012).

Los estados anamórficos se caracterizan por producir grandes cantidades de conidios luego de matar al huésped. Estos conidios sobreviven en el ambiente por prolongados períodos de tiempo dependiendo de las condiciones bióticas y abióticas. El estado anamorfo de muchos hongos entomopatógenos suele ser generalista e infecta una amplia variedad de taxa. A diferencia de los conidios que son liberados poco tiempo después de la muerte del huésped, las ascosporas, de origen sexual son producidas y liberadas por estromas que se forman en el mismo individuo luego de varios meses de manera paulatina. Aparentemente el rango de hospedadores de las formas teleomorfas, suele ser mucho más estrecho que el de los anamorfos, incluyendo algunos estrictamente especialistas (Vega et al. 2012).

Spatafora et al. (2007) y Sung et al. (2008), sugieren que los Hypocreales de hábitos entomopatógenos tuvieron su origen en hongos asociados a plantas y que durante el curso de la evolución ocurrieron eventos de cambios de huésped en los que hongos patógenos de plantas fueron capaces de infectar insectos. Este suceso de cambio de huésped sumado a otros en la historia evolutiva del grupo ha moldeado la diversidad que se observa en la actualidad.

Los hongos entomopatógenos ofrecen una alternativa amigable para el ambiente ya que permitirían disminuir la utilización de insecticidas químicos para el control de plagas. De las 750 especies descritas de hongos patógenos de insectos la atención se ha centrado en el desarrollo de formulaciones de unas pocas especies, pertenecientes al Orden Hypocreales ya que se trata de organismos cuyos rangos de hospedadores son más amplios y son factibles de manipular para su producción masiva. Las ventajas que estos hongos presentan para ser utilizados en programas de control de plagas son: su alta especificidad, dispersión natural y posibilidad de cultivo in vitro, manteniendo la patogenicidad, inocuidad para vertebrados y la posibilidad de provocar un control

permanente una vez establecidos en el ambiente. Asimismo, otra ventaja importante que presentan estos microorganismos es que la infección generalmente se produce por contacto, a través del tegumento de los insectos, no siendo necesaria su ingesta (Leger et al. 2011).

Ciclo de vida de los hongos entomopatógenos

Los Hypocreales patógenos de insectos poseen complejos ciclos de vida que involucran estadios fuera de los huéspedes como conidios asexuales (producidos por los estadios anamórficos) y también como esporas sexuales (producidas por los estadios teleomórficos), que pueden persistir por prolongados períodos de tiempo en el suelo o en plantas.

Los hongos entomopatógenos deben enfrentar distintas adversidades para producir suficientes conidios en cada generación para mantener poblaciones viables. En principio la transmisión exitosa generalmente requiere la liberación de cantidades masivas de esporas que maximicen las probabilidades de encuentro con los huéspedes y que las esporas germinen e inicien la penetración del exoesqueleto relativamente rápido. Las células deben además proliferar dentro del hemocele, músculos u otros tejidos del cuerpo del huésped para colapsar el sistema inmune del insecto de modo que el huésped muera rápido. Además el patógeno debe poder optimizar la producción de esporas y la dispersión ante condiciones ambientales adversas. Para poder enfrentar estos desafíos los entomopatógenos debieron desarrollar estrategias evolutivas convergentes en los principales linajes de hongos patógenos de insectos en cuanto a los mecanismos fisiológicos y características morfológicas (Butt et al. 2016).

Para completar su ciclo de vida exitosamente, los entomopatógenos deben contactar a un hospedero, poder entrar a su cuerpo, reproducirse dentro de uno o más tejidos del hospedero y emitir algún estado de vida que subsecuentemente contacte e infecte nuevos hospederos. Las fases que determinan la invasión y desarrollo de los hongos entomopatógenos son la adhesión de los conidios, su germinación, la diferenciación en estructuras infectivas, la penetración, la colonización del hemocele de los insectos y la esporulación posterior a la emergencia del cadáver del huésped (Boomsma et al. 2014)(Figura 3).

Además, los hongos entomopatógenos son capaces de secretar distintos metabolitos que suelen estar vinculados a la virulencia y especificidad (Gibson et al. 2014); aquellos que producen las especies del género *Beauveria* son los más conocidos y estudiados, e incluyen sustancias como la bassianina, bassiacridina, bassianolido, tenellina y oosporeina, mientras que las especies del

género *Metarhizium* producen cyclosporina, swainsonina, y 39 variantes de destruxinas (Molnar et al. 2010; Wang & Leger 2005; Gibson et al. 2014).

El tiempo que transcurre hasta causar la infección generalmente varía entre 2 y 20 días, dependiendo del tamaño del huésped, la especie fúngica, la dinámica de producción de esporas y las condiciones ambientales. Los conidios de los Hypocreales son pequeños (menores a 8 μm) y se producen en gran número en estructuras externas al huésped, esta estrategia maximiza el éxito reproductivo dependiendo de la dispersión pasiva por el viento u otras condiciones atmosféricas (Hesketh et al. 2010).

Contacto con el huésped

Existen registros de que algunos artrópodos poseen mecanismos para detectar y evadir el contacto con los hongos entomopatógenos, estos depende de las especies y del estadio del desarrollo. El contacto con el huésped también depende de la oportunidad de los encuentros con este y de que las esporas sean transportadas por el viento, la lluvia u otros organismos. De este modo, la eficiencia del contacto entre un patógeno y sus huéspedes es determinada por los patrones espaciales del estado infeccioso y por los del huésped, como así también por la supervivencia del estado infeccioso a través del tiempo (Van Driesche et al. 2007).

Penetración en el huésped

Una vez que el patógeno ha contactado al huésped, debe penetrar su cuerpo y alcanzar los tejidos susceptibles. Para penetrar las múltiples capas de la cutícula del exoesqueleto de los insectos, los hongos entomopatógenos combinan la acción mecánica y la degradación enzimática. En el caso de los Hypocreales se necesita de un gran número de conidios para que la infección del insecto sea exitosa (Inglis et al. 2012) (Figura 4).

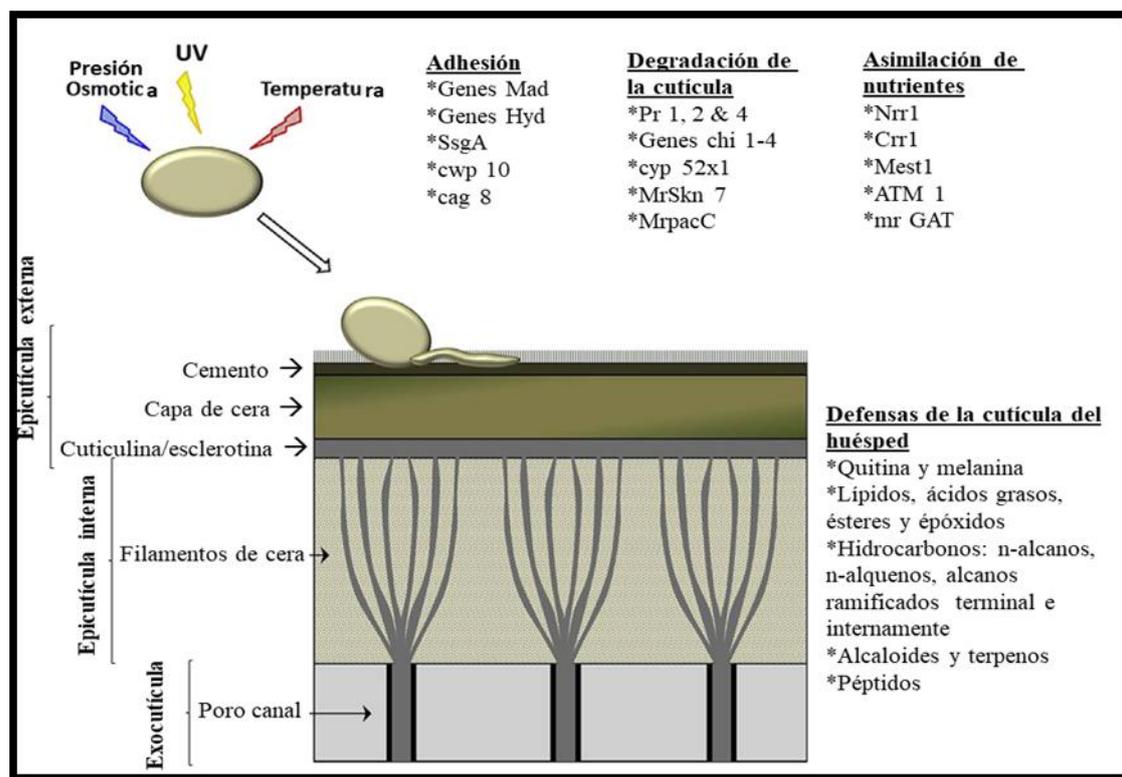


Figura 4: Mecanismo de adhesión y pre-penetración de los conidios fúngicos a la cutícula del huésped. Modificado de Butt et al. (2016).

Adhesión y germinación de los conidios a la superficie del huésped.

El primer paso del proceso infeccioso es la adhesión de los conidios a la superficie del huésped. Las propiedades físicas, químicas y electrostáticas de las superficies de los conidios y de la cutícula de los insectos influyen en este paso. Por ejemplo, la superficie de los conidios de los Hypocreales está cubierta por una capa de hidrofobinas (proteínas que les confieren afinidad a las superficies hidrofóbicas) lo que facilita la adhesión pasiva a superficies como la cutícula de los insectos (Holder & Keyhani 2005). Además, existen en la pared celular de los conidios enzimas que permiten degradar con mayor facilidad los compuestos fungistáticos de la superficie del huésped, liberando nutrientes que estimulan la germinación. Una de ellas fue denominada como “spore-bound Pr1” (Shah et al. 2005) y se encuentra presente en mayores concentraciones en aquellos conidios de cepas virulentas.

En los eventos de adhesión y pre-penetración de los conidios fúngicos al huésped influyen factores ambientales como la luz UV, presión osmótica y la temperatura, también las defensas de la epicutícula del insecto (ácidos grasos fungistáticos y aleloquímicos antifúngicos), es por esto que para hacerles frente los entomopatógenos han evolucionado diferentes mecanismos en los que están

involucrados genes específicos (que se vinculan a la virulencia de la cepa si son expresados) (Figura 4).

Altre & Vandenberg (2001) establecen que la germinación rápida, ante condiciones climáticas favorables, es una característica de las cepas virulentas y que el éxito en la penetración radica además en que se generen múltiples sitios de entrada para así colonizar rápidamente al huésped, superar sus defensas y evitar la competencia con saprófitos oportunistas.

La cutícula es la mayor barrera que deben sobrepasar los hongos entomopatógenos en el proceso infectivo, las interacciones que se dan en esa superficie influyen en la habilidad del patógeno para infectar a los huéspedes (Figura 5). Durante la penetración del exoesqueleto de los insectos, los entomopatógenos liberan distintos tipos de enzimas y generan fuerza mecánica. La actividad enzimática es previa a la formación del tubo germinal del conidio, y queda reflejado en la formación de una pequeña concavidad por debajo de la cutícula del insecto (Schreiter et al. 1994).

La adhesión de los conidios a la capa epicuticular implica la adsorción de las células fúngicas a la superficie del insecto (que es un proceso no específico) seguida por la consolidación de la adhesión (Ortiz Urquiza & Keyhani 2013). La composición química de la capa epicuticular, particularmente el tipo de lípidos, es variable entre las distintas especies de insectos, e incluye hidratos de carbono de longitud variable que influye en la capacidad de los entomopatógenos para reconocerla y penetrarla (Pedrini et al. 2007). Los hongos como *B. bassiana* son capaces de asimilar los componentes de la capa epicuticular como fuente de carbono mediante la actividad de enzimas como la citocromo P450 monooxigenasa. Se cree además, que dada la gran diversidad en la longitud de las cadenas de los hidratos de carbono de la cutícula de los insectos existen numerosas enzimas secretadas por los entomopatógenos que aun no se conocen (Pedrini et al. 2013).

Luego de la adhesión e hidratación de los conidios, ocurre la germinación de los mismos que involucra el desarrollo de un tubo germinativo y, en algunos casos, la formación de un apresorio (Figura 5). Los apresorios pueden desarrollarse directamente de los conidios, al final del tubo germinal o incluso lateralmente desde hifas. Algunas especies como *Nomuraea rileyi* forman apresorios y pueden penetrar directamente la cutícula (Srisukchayakul et al. 2005), esto no suele ocurrir en las especies de *Beauveria* y *Metarhizium*. La diferenciación del apresorio y su fenotipo, son un paso indispensable en el proceso de infección de los hongos entomopatógenos, y en ella son importantes las señales físico-químicas y nutricionales en la superficie del huésped. La morfología de los apresorios varía desde formas clavadas, esféricas o con forma de copa (Leger et al. 1989). Los apresorios se diferencian en superficies duras, deficientes en nutrientes e hidrofóbicas (Wang & St. Leger 2005). En el proceso de diferenciación, los lípidos son transportados al apresorio en desarrollo y se degradan a moléculas de glicerol, incrementando la presión hidrostática para ejercer

una mayor fuerza, favoreciendo así el proceso mecánico de penetración y anclado del hongo a la cutícula (Wang et al. 2016). En el proceso de penetración los patógenos deben poder atravesar los compuestos fungistáticos de la capa de ceras de la epicutícula y además otras barreras biológicas como el espesor, la mineralización, los inhibidores de proteasas y AMP's de la cutícula (Dubovskiy et al. 2013) (Figura 5).

La susceptibilidad a la infección depende en gran medida del estadio de desarrollo del huésped, aquellos insectos recién mudados son particularmente susceptibles dado que la nueva cutícula no se ha esclerotizado completamente (Liu et al. 2014).

El daño ocasionado a las capas cuticulares y la penetración de la capa epidérmica provocan que se sintetice y acumule melanina en estos tejidos (Figura 5). La acumulación de melanina en la cutícula del insecto no sólo limita el crecimiento de ciertos hongos, actuando como barrera física, sino que además inhibe la síntesis de algunas enzimas que degradan la cutícula, para impedir la penetración cuticular (Leger et al. 1988). Dubovskiy et al. (2013) han demostrado que aquellos morfos de insecto oscuros o melánicos que presentan concentraciones inusuales de melanina en sus cutículas son más resistentes al ataque por patógenos como *B. bassiana* y *M. anisopliae*, estableciendo que existe una correlación positiva entre el melanismo, la actividad de las fenoloxidasas y la resistencia a la infección.

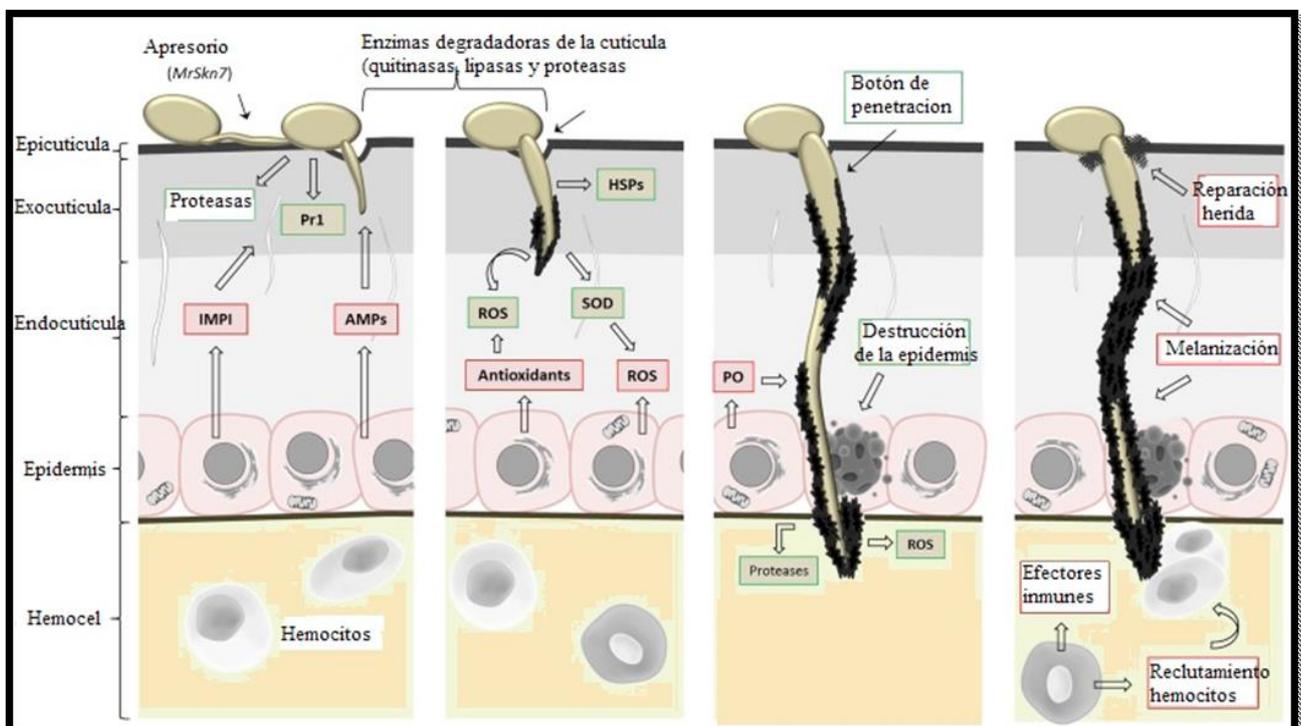


Figura 5: Mecanismo de post-penetración de los conidios de los hongos entomopatógenos. Modificado de Butt et al. (2016).

Penetración dentro del hemocele

Una vez superada la barrera cuticular, el entomopatógeno debe enfrentar el sistema inmune del insecto y además ser capaz de tomar nutrientes para continuar su proliferación. Los Hypocreales desarrollan hifas para poder penetrar entre los espacios intersticiales entre las células musculares del insecto. Además, durante este proceso algunas especies producen toxinas que contribuyen a matar las células del huésped facilitando así la toma de nutrientes por parte del hongo (Vega et al. 2012) (Figura 5).

Reproducción en el huésped

Una vez que el hongo invadió la hemolinfa, se multiplica en el interior mediante cuerpos hifales.

La muerte del insecto se debe a una combinación de tres factores que actúan conjuntamente: la producción de toxinas por parte del hongo, la obstrucción física de la circulación de la hemolinfa por el sistema circulatorio del insecto y el impedimento en la circulación de nutrientes (Goettel & Inglis 1997). El hongo inicia un crecimiento miceliar masivo en el interior del cuerpo del insecto invadiendo los órganos y tejidos del mismo. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie iniciando la formación de conidios, con lo que se puede completar el ciclo infectivo (Pucheta et al. 2006).

Crecimiento por fuera del huésped muerto

Para completar su ciclo de vida, un patógeno debe poder dispersarse desde el huésped y encontrar nuevos hospedadores.

Luego de la liberación de los conidios en el medio ambiente, la continuidad de la población del patógeno depende del contacto con nuevos insectos a los que puede infectar. La presencia del huésped en tiempo y espacio puede ocurrir sólo en algunas áreas y por ciertos períodos de tiempo, para ello los patógenos requieren de adaptaciones para la dispersión y la persistencia. La dispersión en el medio ambiente es llevada a cabo principalmente por el viento y la lluvia, y el contacto con el huésped generalmente es casual. Los encuentros al azar con nuevos huéspedes son más probables si los insectos están congregados. Por esta razón, insectos como las moscas blancas, áfidos y larvas de lepidópteros o aquellos insectos que tienen brotes de población de alta densidad, son especialmente

favorables para la transmisión de la enfermedad (Butt et al. 2016). En la Figura 6 se observa el ciclo de vida completo de un hongo entomopatógeno.

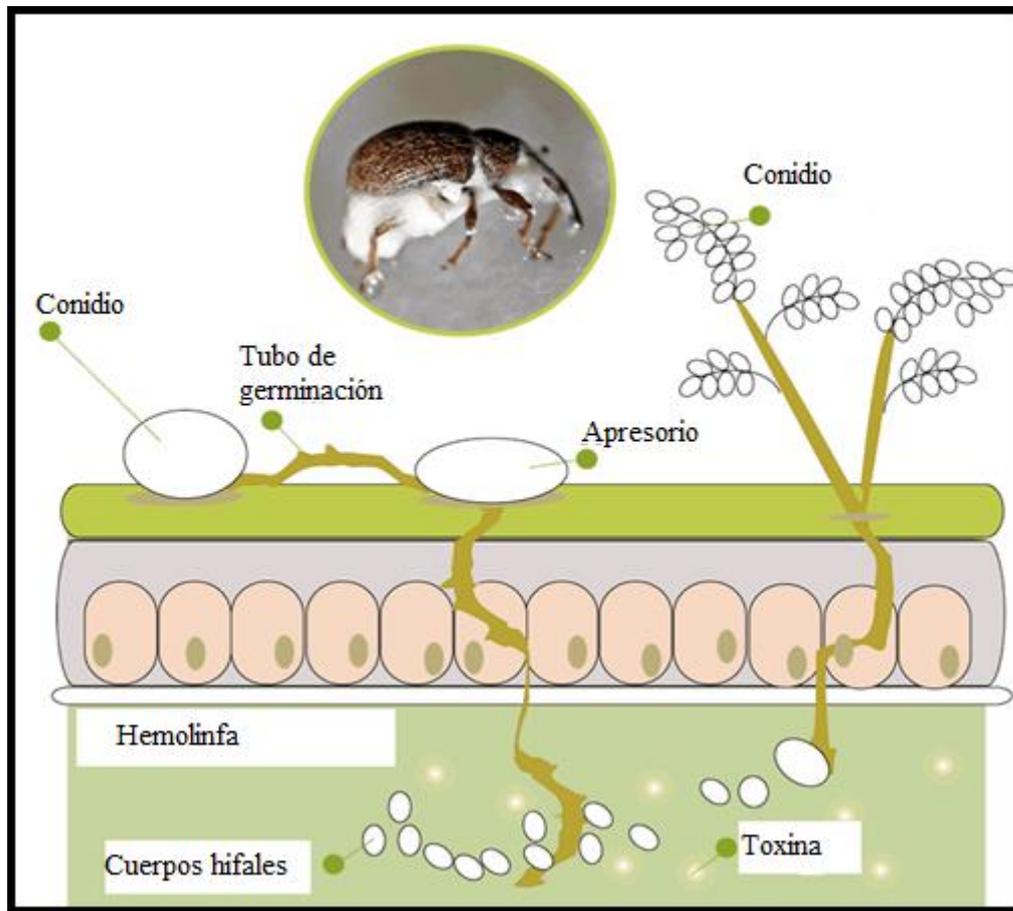


Figura 6: Ciclo de vida generalizado de los hongos entomopatógenos (<http://anatisbioprotection.com/en/news/bioceres-bio-insecticide.html>).

Por otro lado, cuando los huéspedes son poco frecuentes en tiempo o espacio, la supervivencia del patógeno requiere el desarrollo de algún estado resistente que pueda persistir por períodos largos. Dichos estados suelen terminar en el suelo, donde persisten. La lluvia puede salpicar el suelo sobre hojas, lo que mueve algunas esporas de regreso a las plantas, dando una oportunidad para que los nuevos hospederos sean infectados por los patógenos (Van Driesche et al. 2007).

Hongos endófitos

El término “Endófito” se utiliza para designar a aquellos organismos que habitan dentro de las plantas durante algún período de su ciclo de vida colonizando los tejidos internos de estas y sin causarles daño aparente (Petrini 1991).

Los hongos fueron los primeros microorganismos en ser descritos como endófitos por de Bary en el año 1866, pero la importancia o el rol que estos microorganismos juegan (por ejemplo protegiendo las plantas frente al ataque de herbívoros como el ganado o insectos) han sido recientemente demostradas (Vega et al. 2008).

Los hongos endófitos han sido aislados naturalmente de todas las plantas estudiadas hasta el momento (Saikkonen et al. 1998; Suryanarayanan 2013), y se han encontrado colonizando semillas, tallos, hojas y otros órganos y tejidos vegetales (Cherry et al. 1999; Vega et al. 2008; Fűrnkranz et al. 2012).

La transmisión de estos hongos endófitos puede ocurrir de manera vertical desde las semillas o la colonización puede comenzar con la penetración del hongo por aberturas naturales o artificiales presentes en las plantas, como la zona de emisión de la raíz, los estomas, heridas causadas por insectos, prácticas agrícolas, etc. Luego de la penetración, el endófito puede alojarse en cualquier región de la planta. El primer registro demostrando la importancia del rol de un microorganismo endófito fue reportado por Webber (1981), quién demostró que *Phomopsis oblonga*, un endófito de los olmos, los protegía del ataque de un coleóptero vector de *Ceratocystis ulmi*, un hongo patógeno de estos árboles. Por otro lado, el primer registro que demuestra la capacidad de los hongos endófitos de producir toxinas que protegen a las plantas frente al ganado, fue realizado por Bacon et al. (1977) en el estudio de *Epichloe typhina* un hongo endófito de la gramínea *Festuca arundinacea*.

Es importante mencionar que la interacción entre el microorganismo endófito y la planta es considerada simbiótica, ya que el primero, a cambio de nutrientes que la planta le provee, realiza una defensa indirecta frente al ataque de insectos o animales herbívoros (Kim & Kim 2008; Powell et al. 2009; Quesada-Moraga et al. 2009). Existen interesantes clasificaciones de los endófitos fúngicos, una de ellas los divide en dos categorías ecológicas en términos de su diversidad o roles funcionales (Bamisile 2018). Estos grandes grupos se denominan Clavicipitaceae y no-Clavicipitaceae, los primeros son comunes en gramíneas, mientras que los segundos son predominantes en especies vegetales vasculares y no vasculares (Rodríguez et al. 2009). A su vez, los endófitos fúngicos pueden clasificarse en base al modo de reproducción como sexual y no sexual (Brem & Leuchtmann 2001). Por ejemplo, los hongos *Epichloë* y *Neotyphodium* han sido diferenciados en función al modo de reproducción en sexual y asexual respectivamente (Schardl & Craven 2003). Otra clasificación posible es la basada en el modo de transmisión en el huésped, así los endófitos pueden ser vertical u horizontalmente transmitidos, los primeros lo hacen directamente de la planta a su descendencia y los segundos son aquellos endófitos que se transmiten entre individuos de una misma población (Saikkonen et al. 2013). En cuanto a la fuente de nutrición, los endófitos fúngicos pueden clasificarse como necrótrofos, si se alimentan de materia orgánica

muerta o biótropos si se alimentan de materia viva (Delaye et al. 2013). En base a la expresión de la infección fúngica los endófitos se denominan sintomáticos (si expresan síntomas en sus huéspedes) o asintomáticos (no expresan síntomas) (Pinto et al. 2000). Por último, en relación a el órgano vegetal que afectan, los endófitos fúngicos se clasifican en endófitos foliares, que son aquellos que colonizan principalmente los tejidos aéreos de la planta (Meyling et al. 2011) y como endófitos de raíz a aquellos que colonizan los tejidos de la rizósfera como por ejemplo *Fusarium* spp., *Metarhizium* spp., *Piriformospora indica*, y *Glomus* spp. (Wyrebek et al. 2011).

Hongos entomopatógenos como endófitos

La colonización endofítica de los tejidos vegetales por parte de los Hypocreales puede ocurrir sobre o por debajo del sustrato, añadiendo complejidad a sus ciclos de vida, y las plantas pueden beneficiarse por la presencia de estos hongos si facilitan la adquisición o conversión de nutrientes (Cory & Ericsson 2009). La utilización de los hongos entomopatógenos como endófitos es una reciente herramienta que puede ofrecer oportunidades para mejorar la eficacia del control biológico ejercida por estos microorganismos como alternativa a las aplicaciones convencionales de micoinsecticidas, que se hacen principalmente a modo de asperjados inundativos (Vega et al. 2009; Jaber & Ownley 2017).

Hongos entomopatógenos como *Beauveria*, *Cladosporium*, *Cordyceps*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*, entre otros, han sido frecuentemente aislados como endófitos. Entre las plantas de importancia agrícola han sido hallados colonizando *Citrus* sp. (Glienke-Blanco et al. 2002), *Glycine max* (Pimentel 2006), *Theobroma cacao* (Rubini et al. 2005), *Saccharum* (Stuart et al. 2010), *Vitis labrusca* (Brum et al. 2012), *Coffea arabica* (Saucedo-García et al. 2014) y *Zea mays* (Pamphile & Azevedo 2002). Estudios recientes reportan sobre el potencial de los hongos entomopatógenos como endófitos para controlar plagas fitófagas cuando estas son alimentadas con plantas colonizadas por estos hongos (Quesada-Moraga et al. 2009; Gurulingappa et al. 2011; Gange et al. 2012; Gathage et al. 2016; Resquín-Romero et al. 2016; Sánchez-Rodríguez et al. 2018). Estos trabajos proveen resultados que reflejan que las plantas colonizadas por los endófitos quedan protegidas del daño que los insectos provocan, debido a que ciertos parámetros reproductivos de estos insectos plaga se ven afectados por la presencia del endófito. Los mecanismos por los cuales los hongos entomopatógenos endófitos reducen los daños provocados por las plagas son diversos, como por ejemplo la disminución de la tasa de desarrollo de los insectos plaga (Akello & Sikora 2012; Akutse et al. 2013), disuasión alimentaria (McGee 2002; Vega 2008) y retraso del

crecimiento, disminución de la supervivencia y la oviposición (Lacey & Neven 2006; Martinuz et al. 2012).

Vidal & Jaber (2015) plantean que la utilización de los hongos entomopatógenos como agentes de biocontrol endófitos podría permitir sobrevenir a muchas de las desventajas asociadas a la aplicación de estos agentes de control de forma inundativa ya que, como endófitos, los hongos entomopatógenos están menos expuestos a los daños provocados por la radiación UV, y a otras adversidades microclimáticas (desección, etc), son más compatibles con otros grupos de enemigos naturales, y además son capaces de atacar ciertas plagas que de otro modo serían difíciles de controlar debido a sus hábitos crípticos o por el modo en el que se alimentan en el envés de las hojas (Jaronski 2010; Jaber & Ownley 2017; Akutse et al. 2014; Jaber & Araj 2018). Sumado a esto, el uso conjunto de hongos entomopatógenos como endófitos con otros productos compatibles (por ejemplo insecticidas bioracionales, extractos botánicos, etc) podría aumentar la eficacia del nivel de control (Gurulingappa et al. 2011).

Antecedentes.



Las plagas son las principales responsables de las mermas en los rendimientos de las cosechas. Según estimaciones de la FAO, las pérdidas económicas en los cultivos, ocasionadas por las mismas, fluctúan entre un 25 y 35%, variando en magnitud de acuerdo a la región, año, tipo de cultivo y plaga considerada (www.fao.org). En Argentina, el control de plagas se realiza casi exclusivamente a través del control químico, mediante el empleo de plaguicidas (insecticidas, fungicidas y herbicidas), prevaleciendo el uso de los de amplio espectro (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides) (CASAFE 2015). El uso abusivo de estos plaguicidas de amplio espectro en agroecosistemas ha traído aparejado consecuencias ecológicas desfavorables, como la contaminación del suelo, agua y atmósfera con un efecto nocivo generalizado sobre el medio ambiente. Además la permanencia de estos insecticidas químicos en el medio ambiente, favorece la incorporación a las cadenas tróficas, la bio-acumulación en los tejidos grasos humanos y de animales con las trágicas consecuencias que esto acarrea. Particularmente en el cultivo del tabaco se emplean grandes cantidades de estos insumos, incluso en algunas regiones continúa el uso ilegal del bromuro de metilo, entre otros pesticidas prohibidos. Esta situación se ve agravada en cuanto a la repercusión sobre la salud de la población, por el hecho que la actividad tabacalera requiere de trabajo manual y la mano de obra que emplea se ve en constante contacto con estos químicos perjudiciales (SAGyP 2009).

Varios géneros de hongos entomopatógenos han sido aislados como endófitos de distintas especies de plantas, mientras que otros han sido inoculados artificialmente en plantas mediante diversas técnicas, con el objetivo final de controlar a distintas especies de insectos plagas que pudieran atacarlas (Vega et al. 2008; Gurulingappa et al. 2010). Sánchez-Rodríguez et al. (2018) registraron un 30-57% de mortalidad en larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) al ser alimentadas con plantas de trigo colonizadas con *Beauveria bassiana*. Gange et al. (2012) estudiaron los hongos endófitos de *Cirsium arvense* (L.) Scop., algunos de ellos fueron seleccionados para evaluar los efectos sobre larvas de *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) y adultos de *Cassida rubiginosa* (Coleoptera: Chrysomelidae), estos autores encontraron que dichos hongos eran capaces de reducir la alimentación y el crecimiento de los insectos, cuando las plantas estaban colonizadas con *Cladosporium cladosporoides* y *Trichoderma viride*. Gurulingappa et al. (2011) registraron altos niveles de mortalidad del pulgón plaga *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) por cepas endófitas de los hongos entomopatógenos *Lecanicillium lecanii* y *B. bassiana* en plantas de algodón. Quesada-Moraga et al. (2009) comprobaron efectos en la protección sistémica de plantas de *Papaver somniferum* L. frente a larvas de *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) que presentaban a *B. bassiana* como endófito. Garrido Jurado et al. (2017) lograron establecer mediante aplicaciones foliares a *B. bassiana* como endófito en plantas de

melón y demostraron que la plaga *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) ingería hifas del endófito. La ingestión del endófito sumado a la producción de metabolitos secundarios de la cepa evaluada permitió controlar la plaga. Rondot & Reineke (2018) demostraron también la capacidad de cepas comerciales de *B. bassiana* para establecerse como endófito de *Vitis vinífera* y controlar la tasa de infección de las plagas de ese cutivo, *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) y *Empoasca vitis* (Hemiptera: Cicadellidae). A su vez, Sánchez-Rodríguez et al. (2018) comprobaron la capacidad dual de *B. bassiana* como endófito tanto para incrementar la producción de espigas en trigo, como para controlar larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Asimismo, resultados prometedores fueron recientemente obtenidos por Jaber et al. (2018), quienes estudiaron los efectos combinados de *B. bassiana* y *Metahizium bruneum* como endófitos junto al empleo de extractos botánicos en plantas de *Brassica oleracea* para el control de *B. tabaci*.

Los endófitos fúngicos de *N. tabacum* han sido escasamente estudiados hasta el momento. Spurr & Welty (1974) reportaron aquellos hongos presentes en las hojas de la variedad C298 en Estados Unidos, registrando frecuentemente a *Alternaria* y *Cladosporium* como endófitos de las hojas. Por otro lado Jin et al. (2017), estudiaron las comunidades de hongos endófitos en raíces de plantas de tabaco en China en búsqueda de especies relevantes en bioremediación, y los géneros más comúnmente encontrados fueron *Boeremia*, *Epicoccum*, *Phoma* y *Pyrenochaeta*.

En Argentina, existen registros sobre la presencia de hongos entomopatógenos en distintas regiones del país (Scorsetti et al. 2007, 2010, 2012; Yasem de Romero et al. 2008; Pelizza et al. 2010; Bich et al. 2015) pero particularmente no existen a la fecha registros de hongos entomopatógenos asociados al cultivo del tabaco.

Los antecedentes previamente expuestos, además de la escasa o nula información sobre el tema en este país y la importancia de reducir el uso de insecticidas químicos de alta toxicidad en los cultivos de tabaco, son los que fundamentan e impulsaron la realización del presente trabajo de tesis doctoral. Este estudio tuvo como principal finalidad, relevar la diversidad de hongos entomopatógenos asociados al cultivo de tabaco en la provincia de Jujuy, Argentina, como microorganismos capaces de controlar los principales insectos plaga del cultivo de tabaco.

Hipótesis y Objetivos



Hipótesis de trabajo

Los hongos entomopatógenos nativos son efectivos para el control biológico de insectos plaga de cultivos de tabaco de la Argentina.

Objetivo general

Evaluar la capacidad biocida de los hongos entomopatógenos nativos contra las principales plagas del cultivo de tabaco en la provincia de Jujuy.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar las comunidades de hongos endófitos presentes naturalmente en el cultivo de tabaco.
- 2) Realizar la prospección, detección y aislamiento de hongos entomopatógenos en los insectos plaga y presentes en suelos de cultivos de tabaco de la provincia de Jujuy.
- 3) Caracterizar las cepas aisladas morfológica y molecularmente, así como también por su capacidad biocida frente a plagas del cultivo de tabaco.
- 4) Evaluar la capacidad endofítica de los hongos entomopatógenos aislados en condiciones de laboratorio.
- 5) Evaluar la preferencia alimenticia, efectos sub-letales y patogenicidad de los insectos plaga del cultivo de tabaco que se alimenten de plantas tratadas con la cepa de hongo entomopatógeno con mejor capacidad endofítica.

CAPÍTULO 1

Aislamiento de hongos endófitos naturales del cultivo de tabaco en la Provincia de Jujuy, Argentina



Objetivo

Caracterizar las comunidades de hongos endófitos presentes naturalmente en el cultivo de tabaco.

Introducción

Se estima que existen aproximadamente 1,5 millones de especies de hongos en nuestro planeta pero sólo un pequeño porcentaje de ellas han sido descritas (Hawksworth 2001). La importancia de registrar y describir la mayor cantidad posible de especies fúngicas, radica en el potencial que las especies endófitas podrían tener como fuente potencial de nuevos antibióticos, enzimas, tinturas, como controladores biológicos de plagas y enfermedades y como productores de hormonas de crecimiento (Suryanarayanan et al. 2013).

Los hongos endófitos son usualmente definidos como aquellas especies que habitan entre los tejidos de las plantas durante parte o todo su ciclo biológico sin causar daño aparente a sus huéspedes (Rodríguez et al. 2009). Han sido aislados de casi todos los órganos de cada especie vegetal estudiada y son componentes importantes de la biodiversidad fúngica (Currie et al. 2014). Existen evidencias, que están presentes incluso en tejidos vegetales fosilizados, por lo que las relaciones endófito-huésped han evolucionado desde el momento en que las plantas vasculares han aparecido en la tierra (Redecker et al. 2000). La planta brinda al endófito protección, nutrientes y dispersión para la nueva generación de microorganismos (Muller & Kraus 2005). Por otro lado, se cree que los endófitos son los responsables de la adaptación de las plantas al estrés abiótico (sequía, altas temperaturas y salinidad, efectos adversos de la luz solar y toxicidad por metales), así como también a factores bióticos (herbívoros, nematodos, insectos y patógenos) (Waller et al. 2005; Zhang et al. 2006; Rodríguez & Redman 2008; Bae et al. 2009; Hartley & Gange 2009; Weyens et al. 2009; Rocha et al. 2011; Saikkonen et al. 2013). Aly et al. (2010) sostienen que la protección brindada a las plantas se logra principalmente por los productos naturales que los endófitos liberan. Esta característica los hace particularmente interesantes desde el punto de vista tecnológico ya que son una de las mayores fuentes potenciales de nuevos y útiles metabolitos activos biológicamente (Schulz et al. 2002; Strobel & Daisy 2003; Tomita 2003) lo que ha derivado en una gran cantidad de estudios referidos al rol de estos microorganismos en las plantas huésped. Sin embargo, hasta el momento se han explorado sólo las comunidades de endófitos de muy pocas especies vegetales (Hyde & Soyong 2008) haciendo necesario describir la diversidad de endófitos presentes en distintas plantas para comprender qué metabolitos secundarios pueden ser hallados. La diversidad

tropical de endófitos es poco conocida debido a que las investigaciones en el área han sido siempre muy limitadas, especialmente en países en vías de desarrollo (Arnold & Lutzoni 2007).

Hasta el momento, existen limitados estudios sobre los endófitos fúngicos de *N. tabacum*. (Spurr & Welty 1974; Jin et al. 2017), además existen algunos artículos relacionados con bacterias endófitas (Mastretta et al. 2009; Quin-Duan et al. 2013). Particularmente Spurr & Welty (1974) y Jin et al. (2017) han registrados algunas de las comunidades fúngicas presentes sólo en hojas y raíces de la planta respectivamente. Estos estudios se llevaron a cabo en Norteamérica y China, registrando los siguientes géneros fúngicos como endófitos: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Boeremia*, *Epicoccum*, *Phoma* y *Pyrenochaeta* entre otros menos frecuentes.

Debido al interesante rol que estos hongos juegan en los ecosistemas y en la producción de moléculas bioactivas, es necesario explorar su diversidad (Tan & Zou 2001).

En este sentido, el presente capítulo tiene como objetivo (1) estudiar el patrón de colonización y la distribución de los endófitos fúngicos en distintos órganos de las plantas de tabaco y (2) estudiar la diversidad de los endófitos fúngicos de esta especie.

Materiales y Métodos

Colecta de las muestras

Las plantas de *N. tabacum* (Variedad Virginia K394) fueron muestreadas en cuatro fincas privadas localizadas en la zona tabacalera de la Provincia de Jujuy, durante el mes de diciembre de 2014 (Tabla I-1). En cada finca, se delimitaron parcelas de 10 x 10 metros que incluían 60 plantas cada una. Mediante la técnica de la transecta, se tomaron 10 muestras por parcela considerando aquellas ubicadas en el centro y también en la periferia de las parcelas, de este modo el número total de plantas colectadas en la zona de estudio fue de 40 ejemplares. Se obtuvieron plantas completas (mediante la utilización de una pala) de *N. tabacum* seleccionadas al azar que no presentaban signos de enfermedad alguna y que crecían a varios metros de distancia unas de otras. Cada planta se obtuvo entera, y posteriormente fue separada en hojas, tallos y raíces. Cada uno de estos órganos de la planta fue colocado en bolsas de polietileno estériles que se mantuvieron refrigeradas hasta su procesamiento en laboratorio (Figura I-1).

Tabla I-1: Sitios de muestreo de plantas de *Nicotiana tabacum*.

	Coordenadas Geográficas	Altura (msnm)
FINCA 1	24°25' 8.3'' S 65°01'26.8'' O	796
FINCA 2	24°33'37.1'' S 64°54'36.8'' O	610
FINCA 3	24°29'50.8'' S 64°59'19.6'' O	584
FINCA 4	24°29'02.6'' S 64°58'21.7'' O	706

**Figura I-1:** Recolección y preservación del material vegetal para la obtención de hongos endófitos.

Aislamiento de los hongos endófitos.

Los endófitos fúngicos fueron aislados de los tejidos vegetales mediante la técnica empleada por Vega et al. (2008) modificada. Para ello, las muestras fueron cuidadosamente enjuagadas con agua corriente durante diez minutos. Posteriormente, se procedió a esterilizar las superficies de los diferentes órganos bajo cámara de flujo laminar al sumergirlas en etanol 70% (v/v) durante dos minutos, seguido de tres minutos en hipoclorito de sodio 2.6% (v/v) y finalmente con tres enjuagues en agua destilada estéril que se renovó cada vez. Seguidamente fueron secadas con papel estéril, y

se removieron los bordes con bisturí estéril para eliminar el tejido muerto resultante del proceso de desinfección. De cada hoja se obtuvieron 6 segmentos de 10 x 15 mm cada uno y de los tallos y raíces se obtuvieron segmentos de 1 cm de longitud. Los segmentos vegetales fueron transferidos a placas de Petri conteniendo medio de cultivo Agar Papa Glucosado (APG) (Britania S.A., Buenos Aires, Argentina) adicionado con 0,1% de un stock de antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias (Posada et al. 2007). La efectividad del proceso de esterilización se corroboró sembrando en cajas de Petri conteniendo APG, el agua del último enjuague de las muestras (Schulz et al. 1998).

Se sembraron un total de 2160 fragmentos, 720 de cada uno de los órganos vegetales estudiados. Las placas fueron rotuladas e incubadas en estufa bajo condiciones ambientales controladas ($24 \pm 2^\circ\text{C}$, en oscuridad). El crecimiento de las distintas especies de hongos, que se encontraran como endófitos en los distintos órganos de las plantas de tabaco, como así también cualquier contaminante que pudiera aparecer en las cajas donde se sembró el agua final del proceso de esterilización de las muestras, fueron observadas cada 48 h. durante un mes.

Aquellas colonias fúngicas emergentes de los márgenes de los segmentos vegetales fueron transferidos a cajas de Petri nuevas que contenían APG mediante la técnica de “Hyphal tipping” (Strobel et al. 1996) para su purificación. Los cultivos puros obtenidos fueron rotulados y almacenados para su posterior determinación (Figura I-2). Aquellas cepas fúngicas que no mostraron estructuras reproductivas en este medio de cultivo, fueron transferidos a cajas de Petri que contenían el medio de cultivo Agar Extracto de Malta (AEM) y fueron incubadas a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, en oscuridad para favorecer su esporulación.

Identificación morfológica de los hongos endófitos

Los cultivos fúngicos fueron examinados periódicamente y fueron agrupados en morfotipos de acuerdo a las siguientes características de las colonias: forma del micelio, textura de la superficie del micelio, color de las colonias y tasa de crecimiento del micelio (Hawksworth 1991; Nagamani et al. 2006).

La identificación microscópica de los endófitos se realizó seleccionando 1 o 2 aislamientos de cada uno de los morfotipos definidos según los criterios antes mencionados (Figura I-3). Todos los preparados fueron montados entre porta y cubre objetos de vidrio, teñidos con azul de algodón (Lactofenol de Amann) y fueron sellados con esmalte de uñas, para evitar así su posterior deshidratación. La morfología y características de las estructuras reproductivas y esporas fueron

analizadas utilizando bibliografía general y específica (Barnet & Hunter 1998; Domsch et al. 2003; Leslie & Summerell 2006; Nagamani et al. 2006; Seifert et al. 2011). Los aislamientos fúngicos que no esporularon en ninguno de los dos medios de cultivo utilizados fueron designados como '*mycelia sterilia*' y asignados a morfotipos de acuerdo a características de los cultivos (Lacap et al. 2003; Guo et al. 2008).

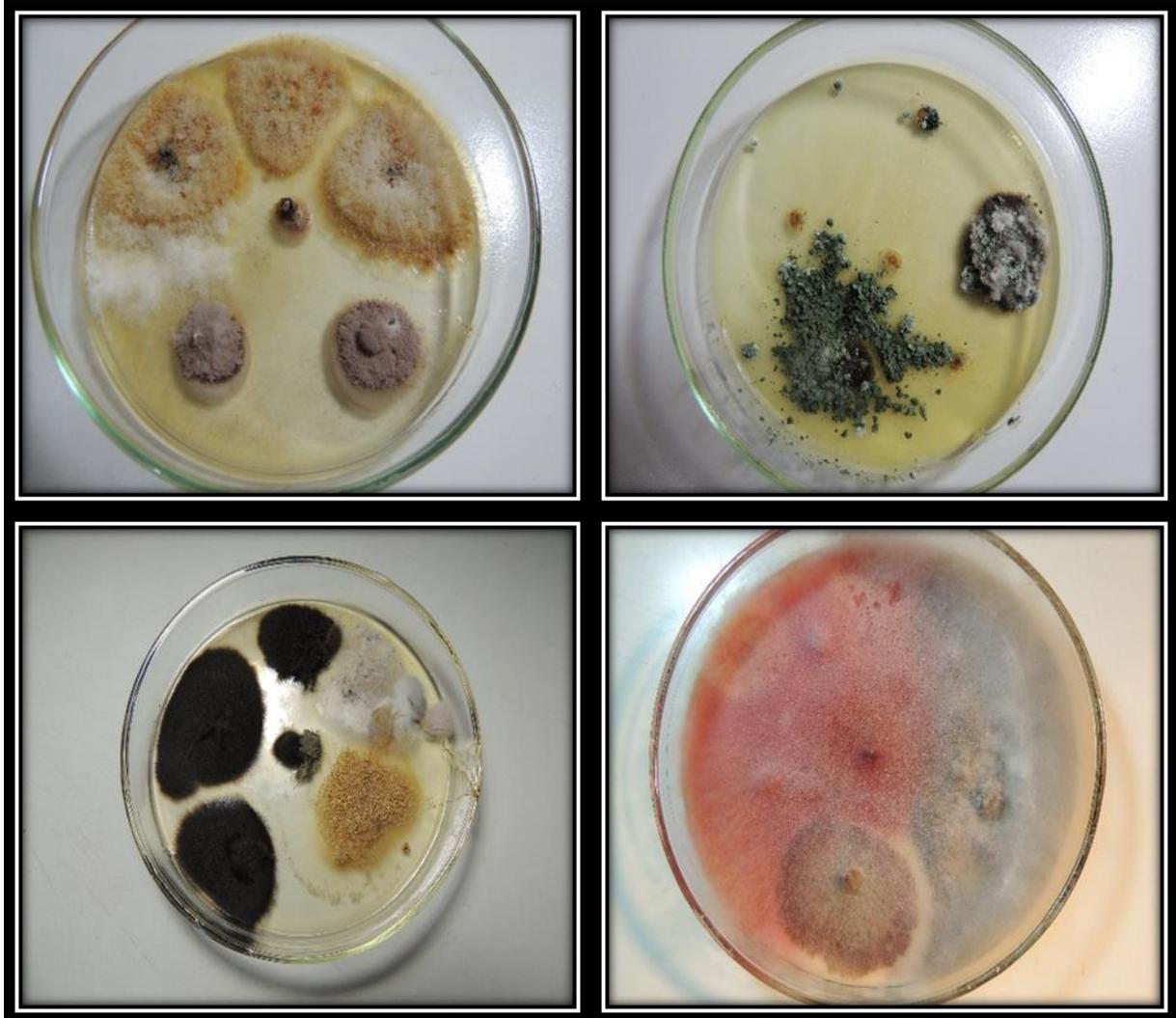


Figura I-2: Endófitos naturales presentes en plantas de *Nicotiana tabacum*, emergiendo del tejido vegetal previo a su purificación e identificación.

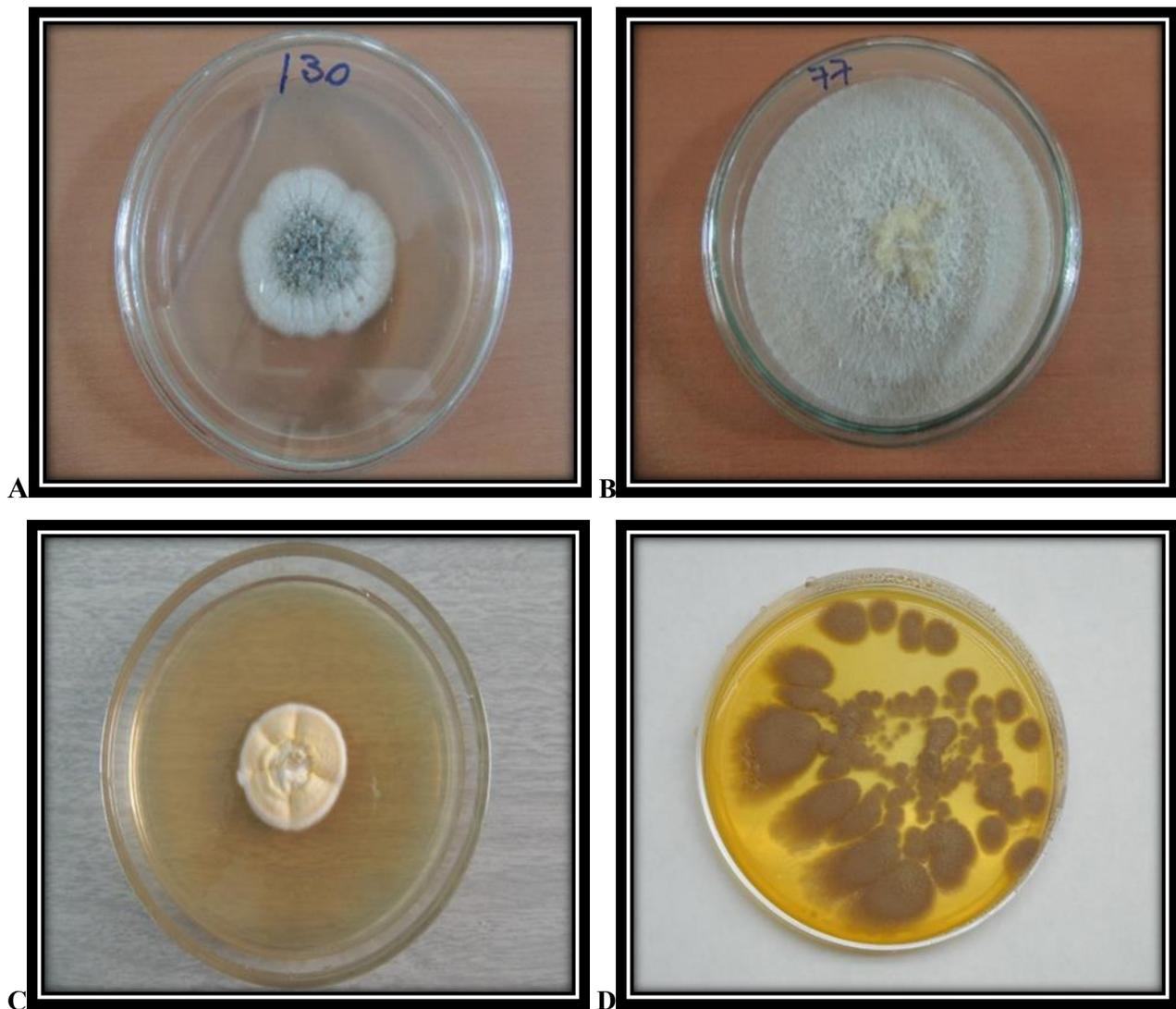


Figura I-3: Cultivos puros de algunos de los endófitos naturales presentes en plantas de *Nicotiana tabacum* A-*Penicillium* sp. B-*Fusarium* sp. C-*Mycelia sterilia* 1 y D-*Aspergillus terreus*.

Patrón de colonización y aislamiento de los hongos endófitos

La frecuencia relativa de los endófitos fúngicos en cada órgano vegetal fue calculada como la abundancia de una determinada especie dividida por el total de hongos aislados de ese órgano en particular.

Para establecer la ocurrencia fúngica se calcularon las tasas de colonización y aislamiento para cada órgano. La tasa de colonización (CR) fue calculada como el número de fragmentos de los que uno o más endófitos fueron aislados, dividida el total de fragmentos sembrados. La tasa de aislamiento (IR) fue computada como el número de endófitos fúngicos aislados divididos por el total del número de fragmentos sembrados.

$$CR = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de segmentos en una muestra } \geq 1 \text{ aislamiento}}{\text{N}^\circ \text{ total de segmentos en la muestra}}$$

$$IR = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de aislamientos en una muestra}}{\text{N}^\circ \text{ total de segmentos en la muestra}}$$

Para comparar las CR e IR de los distintos órganos de *N. tabacum*, cuando no se cumplieron los supuestos para aplicar un Análisis de la Varianza, los datos fueron transformados al $\ln(x)$ y si siguieran aun sin cumplirlos se aplicó un test no paramétrico (test de Kruskal-Wallis y test de Dunn para comparaciones múltiples).

Análisis de la diversidad del complejo fúngico.

Con el objetivo de evaluar la riqueza específica de cada órgano del muestreo realizado se utilizó el software Estimate S (Colwell 2013 versión 9), utilizando 1000 corridas de bootstrapping con reemplazo.

Existen varios métodos para cuantificar la diversidad a nivel local o alfa. Para estimar el número de especies cuando no existen datos previos de la distribución de las mismas o cuando se cuenta con una muestra pequeña, pueden emplearse varios estimadores no paramétricos. En este caso se seleccionaron el índice de Chao 2, que estima el número de especies esperadas considerando la relación entre el número de especies únicas y el número de especies duplicadas, y por otro lado el de Jackknife 1 que considera el número de especies que solamente ocurren en una muestra además de las que ocurren solamente en una y dos muestras.

La diversidad alfa fue estimada además a través de los índices de Shannon-Weaver (H') y de Simpson. El índice de Shannon-Weaver (H') es un estadístico que brinda información independiente del tamaño de la muestra y estima la diversidad de muestras al azar (Poole 1974). Por otra parte, el índice de Simpson es sensible a la abundancia de la o las especies más comunes de una comunidad y puede considerarse como una medida de la dominancia (Simpson 1949). Por ende los índices de Shannon y Simpson combinan en un solo valor la riqueza específica y la abundancia (Groth & Roelfs 1987).

La diversidad beta fue estimada mediante el índice de similitud de Jaccard que relaciona el número de especies compartidas y el número de especies presentes exclusivamente en cada comunidad. Los valores del índice fluctúan entre 0, cuando no existen especies compartidas entre las comunidades y 1, cuando todas las especies son compartidas. A su vez, las similitudes entre las comunidades de hongos endófitos de raíces, tallos y hojas fueron analizadas utilizando un Análisis de Componentes Principales (ACP), que permite ordenar diferencias en la composición específica en ejes ortogonales. Sólo se analizaron aquellos ejes que mostraron tendencias consistentes entre muestras. La matriz de similitud de Jaccard y el ACP fueron realizados utilizando el software PAST (Hammer et al. 2001).

Resultados

Abundancia, diversidad, y tasas de colonización y aislamiento de los endófitos naturales.

Se aislaron un total de 1588 cepas de endófitos fúngicos pertenecientes a los Phyla Ascomycota y Zygomycota, asignados a 31 morfoespecies; 516 pertenecientes a las raíces, 504 a los tallos y 568 a las hojas. Las frecuencias relativas de aislamiento se muestran en la Tabla I-2.

Tabla I-2: Morfoespecies de hongos endófitos aislados de raíces, tallos y hojas de *Nicotiana tabacum* y sus frecuencias.

Morfoespecie	Familia	Orden	Órgano		
			Raíz	Tallo	Hoja
<i>Absidia</i> sp.	Cunninghamellaceae	Mucorales	0,14		
<i>Acremonium</i> sp. 1	<i>Incertae sedis</i>	Hypocreales			0,08
<i>Acremonium</i> sp. 2	<i>Incertae sedis</i>	Hypocreales	0,07	0,1	
<i>Acremonium</i> sp. 3	<i>Incertae sedis</i>	Hypocreales			0,07
<i>Alternaria alternata</i>	Pleosporaceae	Pleosporales			0,07
<i>Alternaria botrytis</i>	Pleosporaceae	Pleosporales			0,12
<i>Alternaria</i> sp. 1	Pleosporaceae	Pleosporales		0,05	
<i>Aspergillus flavus</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	0,14		
<i>Aspergillus niger</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	0,09		
<i>Aspergillus terreus</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	0,15		
<i>Cladosporium</i> sp.	Cladosporiaceae	Capnodiales			0,05

<i>Emericella</i>	Trichocomaceae	Eurotiales			0,06
<i>Emericellopsis</i>	<i>Incertae sedis</i>	Hypocreales	0,1		
<i>Fusarium graminearum</i>	Nectriaceae	Hypocreales			0,12
<i>Fusarium oxysporum</i>	Nectriaceae	Hypocreales	0,12		
<i>Fusarium solani</i>	Nectriaceae	Hypocreales			0,08
<i>Fusarium</i> sp. 1	Nectriaceae	Hypocreales	0,04		
<i>Fusarium</i> sp. 2	Nectriaceae	Hypocreales			0,04
<i>Fusarium tabacinum</i>	Nectriaceae	Hypocreales	0,08	0,11	0,1
<i>Humicola grisea</i>	Chaetomiaceae	Sordariales		0,09	
<i>Mucor</i> sp.	Mucoraceae	Mucorales	0,09		
<i>Nigrospora</i> sp.	Trichosphaeriaceae	Trichosphaeriales	0,06		
<i>Penicillium</i> sp. 1	Trichocomaceae	Eurotiales		0,1	
<i>Penicillium</i> sp. 2	Trichocomaceae	Eurotiales		0,07	0,06
<i>Penicillium</i> sp. 3	Trichocomaceae	Eurotiales	0,1		
<i>Trichoderma viride</i>	Hypocreaceae	Hypocreales	0,09		
Mycelia esterilia 1	-	-		0,05	
Mycelia esterilia 2	-	-		0,06	
Mycelia esterilia 3	-	-		0,05	0,02
Mycelia esterilia 4	-	-			0,06
Mycelia esterilia 5	-	-		0,08	0,07

Los valores medios obtenidos para CR y IR están representados en la Tabla I-3. El test de Kruskal Wallis arrojó diferencias significativas entre las CR de raíces, tallos y hojas (CR: $H=5,92$; $p=0,047$) observándose menor presencia de hongos en la raíz. En cambio, no se observaron diferencias significativas entre las IR de los distintos órganos (IR: $H=0,81$; $p=0,6668$).

Tabla I-3: Tasa de colonización (CR) y tasa de aislamiento (IR) de hongos endófitos de raíces, tallos y hojas de tabaco. Letras diferentes representan diferencias significativas según test de Dunn $p<0,05$.

	CR	IR
Raíz	0,24± 0,07 a	0,78± 0,25 a
Tallo	0,28± 0,08 b	0,71± 0,3 a
Hoja	0,29± 0,13 b	0,68± 0,39 a

Análisis de diversidad

Las curvas de acumulación de especies observadas, y de riqueza esperada de Chao 2 y Jackknife 1 para raíces, tallos y hojas se muestran en la Figura I-4. El análisis para estimar la riqueza de especies de los tres órganos demostró que la riqueza estimada de morfoespecies fue similar a la riqueza observada indicando que el esfuerzo de muestreo fue suficiente.

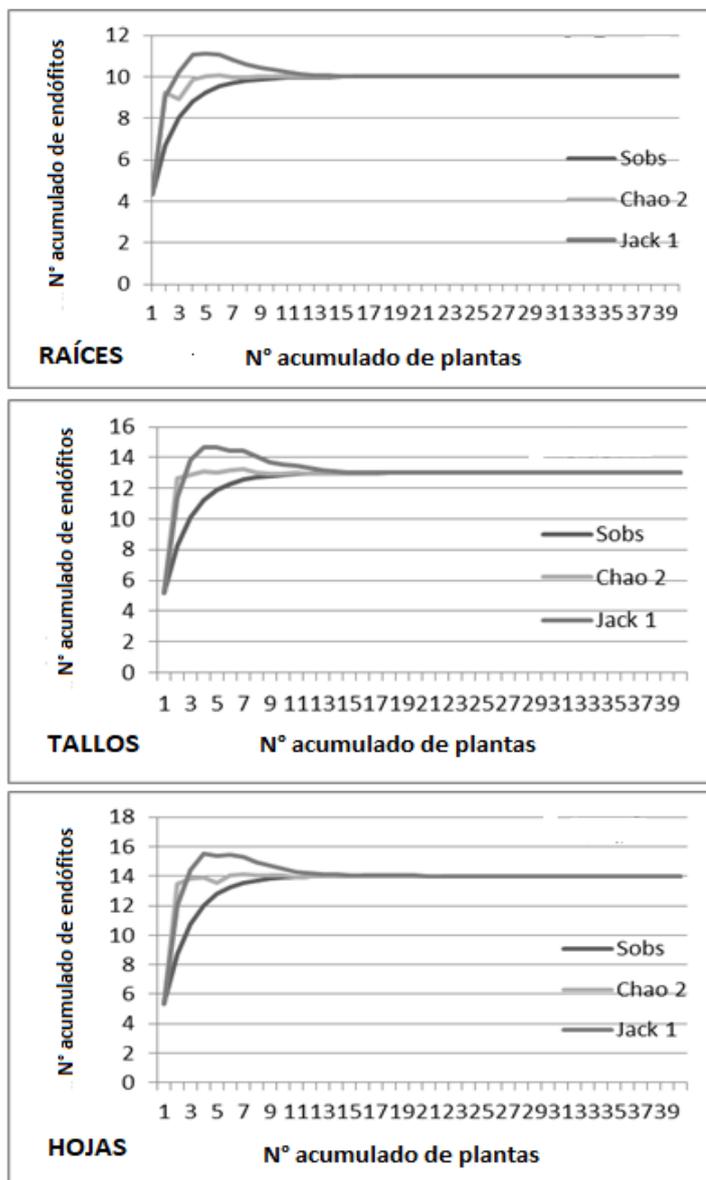


Figura I-4: Curvas de acumulación de especies, riqueza observada (Sobs), riqueza estimada de Chao 2 (Chao 2) y riqueza estimada de Jackknife 1 (Jack 1) para los endófitos fúngicos aislados de A-Raíces, B-Tallos y C-Hojas de plantas de *Nicotiana tabacum*.

Las diferencias estadísticas entre los índices de diversidad de las comunidades fúngicas de los distintos órganos fueron analizadas utilizando un test no-paramétrico (Kruskal Wallis) y el test de Dunn para comparaciones múltiples de a pares, ya que en ningún caso los supuestos del ANOVA se cumplieron. El test mostró diferencias significativas en la diversidad de los endófitos entre los distintos órganos (Jackknife: $H=85,41$; $p<0,0001$; Shannon: $H= 66; 92$, $p<0,0001$; Simpson: $H=58,75$; $p<0,0001$) (Tabla I- 4). Los mayores valores de diversidad fueron hallados en las hojas, para los tres índices calculados.

Tabla I-4: Índices de diversidad de Jackknife, Shannon-Weaner y Simpson de hongos endófitos presentes en raíces, tallos y hojas de plantas de *Nicotiana tabacum*. Letras diferentes en una misma fila representan diferencias significativas según test de Dunn $p<0,05$.

	Raíz	Tallo	Hoja
Jackknife	9,99±0,99 a	13,03 ±1,39 b	13,96±1,51 c
Shannon	2,16±0,18 a	2,41±0,19 b	2,47±0,21 c
Simpson	8,27±1,21 a	10,54 ±1,58 b	11,06±1,72 c

La matriz de similitud de Jaccard (Tabla I-5) muestra que las comunidades fúngicas presentes en los tres órganos estudiados están bien definidas. Los mayores valores de similitud se encuentran entre los endófitos presentes en tallos y hojas ($J=0,173$). El ACP explica el 86,64% de la variabilidad total en los primeros dos ejes. El análisis muestra que la mayoría de los aislamientos estuvieron presentes en un solo órgano. *Aspergillus terreus* Thom, *A. flavus* Link, *A. niger* Tiegh., *Penicillium* sp. 3, *Mucor* sp., *Absidia* sp., *Trichoderma viride* Pers. y *Nigrospora* sp. fueron aisladas exclusivamente de las raíces, mientras que *Penicillium* sp. 1, *Emericellopsis*, *Fusarium oxysporum* E. F. Sm. & Swingle, *Fusarium* sp. 1, *Alternaria* sp. 1, *Humicola grisea* Traaen, Mycelia esterilia 1 y Mycelia esterilia 2 estuvieron presentes sólo en los tallos y *Emericella*, *Acremonium* sp. 1, *Acremonium* sp. 3, *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium* sp. 2, *F. solani* (Mart.) Sacc., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Cladosporium* sp., *Alternaria botrytis* (Preuss) Woudenb. & Crous y Mycelia esterilia 4, fueron aislados sólo de hojas. Por otro lado, *Penicillium* sp. 2, Mycelia esterilia 5 y Mycelia esterilia 3, fueron aislados de tallos y hojas, mientras que *Acremonium* sp. 2 fue aislado de raíces y tallos; en los tres órganos se observó la presencia de *Fusarium tabacinum* (J. F. H. Beyma) W. Gams.

Así, de un total de 31 morfoespecies analizadas, 26 fueron encontradas colonizando exclusivamente un órgano específico, mientras que 5 se hallaron asociadas a más de uno (Figura I-5).

Tabla I-5: Matriz de similitud de Jaccard para los órganos de *Nicotiana tabacum*.

	Raíz	Tallo	Hoja
Raíz	1		
Tallo	0,0952381	1	
Hoja	0,0434783	0,173913	1

Discusión

En este capítulo se estudiaron las comunidades de hongos endófitos presentes naturalmente en las raíces, tallos y hojas del cultivo de *N. tabacum*. Se aislaron 1588 cepas fúngicas a partir de 2160 fragmentos que fueron clasificadas en 31 morfotaxa. Del mismo modo Sun et al. (2008), reportaron una proporción similar de aislamientos de hongos endófitos de tejidos de seis plantas medicinales: *Eucommia ulmoides* Oliv (gutta percha), *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl. (campanita china), *F. giraldiana* Lingelsh (forsitia), *F. ovata* Nakai (forsitia), *Berberis poiretii* Schneid (vinagrega) y *Rhus potanini* Maxim. (hidra venenosa) A su vez, los mismo resultados fueron obtenidos de muestras de hojas, raíz, xilema, flores y tallos de *Tripterygium wilfordii* Hook F. (vid trueno) (Kumar & Hyde 2004). En contraste, el número de endofitos aislados y su frecuencia de aislamiento fue menor en plantas de *Vitex negundo* L (vitex) (Sunayana et al. 2014). Esta diferencia puede explicarse parcialmente debido a que la colonización por parte de los endófitos es afectada por el tipo de huésped y por diferencias climáticas entre sitios de estudio (Collado et al. 2000). Otra posible explicación es que el método utilizado para registrar las infecciones puede subestimar aquellas especies de crecimiento lento, si es que éstas ocurren simultáneamente con especies de crecimiento más rápido (Zheng et al. 2016). El método convencional para estudiar la diversidad de endófitos fúngicos es el método cultivo-dependiente cuya principal limitación es que existen especies que no pueden ser aisladas en ciertos medios de cultivo y algunas especies de crecimiento lento o competidoras débiles también pueden no ser aisladas. En este sentido, existen estudios que demuestran que los endófitos fúngicos recuperados con el método cultivo-dependiente son distintos de los obtenidos mediante técnicas cultivo-independientes y algunas cepas aisladas comúnmente mediante el primero nunca fueron obtenidas con este otro tipo de método (Guo et al. 2001; Arnold et al. 2007). Por ende, sería necesario complementar estos resultados con otras técnicas o con una combinación de métodos capaces de detectar otras especies de endófitos.

En este estudio las tasas de colonización y las tasas de aislamiento para las raíces, tallos y hojas de tabaco fueron en general más bajas que los obtenidas por Kumar & Hyde (2004) para *T. wilfordii*. Asimismo, Choi et al. (2005) y Zhou et al. (2014), también obtuvieron valores más altos de CR e IR que los registrados en esta investigación, en *Brucea javanica* (L.) Merr (kosan) y *Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) (macrosolen) respectivamente. Además, Sunayana et al. (2014) en *V. negundo* obtuvieron tasas de colonización mas elevadas a partir de las raíces, mientras que en este estudio esto ocurrió en las hojas.

Los índices de diversidad de Jackknife, Shannon y Simpson indicaron que la diversidad de endófitos fúngicos en la planta de tabaco es moderada, siendo las hojas las que presentaron la

mayor diversidad y las raíces la menor. En contraste Sun et al. (2008) y Sunayana et al. (2014), reportaron valores más altos del índice H' para los endófitos de tallo respecto de los de hojas en seis plantas medicinales y en *V. negundo* respectivamente.

La composición y estructura de las comunidades de hongos endófitos de este estudio son acordes a aquellas observadas para otras plantas, en las cuales la mayor parte de los hongos recuperados pertenecieron al phylum Ascomycota (Zhou 2014).

Las asociaciones de endófitos de *N. tabacum* comprenden un número de géneros cosmopolitas como *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Hemicola* sp., *Nigrospora* sp., *Mucor* sp entre otros, que han sido previamente aislados como endófitos de hojas, raíces y tallos de distintas plantas (Petrini et al. 1991; Fröhlich et al. 2000; Kumaresan & Suryanarayanan 2001; Toofanee & Dulyamode 2002; Vieira et al. 2011).

Los resultados de este estudio doctoral coinciden con los obtenidos por Spurr & Welty (1974) en Estados Unidos sobre hojas de *N. tabacum* en el que se identificaron 14 especies, mostrando esto una gran diversidad en las comunidades fúngicas de las hojas. Además, *Alternaria* spp. y *Cladosporium* spp. también fueron frecuentemente recuperados, aunque en el presente estudio las especies predominantes encontradas en hojas fueron *F. graminearum* y *U. botrytis*, que no fueron encontradas por los autores antes mencionados.

Spurr & Welty (1974) establecieron que el número y tipo de hongos endófitos en las hojas de *N. tabacum* cambiaba con el crecimiento y desarrollo de las hojas. Por lo antes mencionado, puede hipotetizarse que las comunidades observadas en este trabajo representan una asociación de especies presente en el momento particular en que las muestras fueron colectadas. El hábitat dentro de la planta es un ambiente dinámico en el cual muchos factores pueden afectar la estructura y composición de las especies que colonizan los distintos tejidos. A su vez, otro factor que ha sido previamente demostrado afecta a las comunidades de endófitos de diversas especies vegetales es el espacial. Por este motivo, la composición de especies fúngicas en una planta no es la misma si las muestras son tomadas en diferentes locaciones dado que las características ambientales (temperatura, humedad, precipitaciones y las fuentes potenciales de inóculo) varían de un sitio a otro (Fisher et al. 1992; Kumar & Hyde 2004; Huang et al. 2008; Shankar et al. 2008).

Kumar & Hyde (2004) encontraron que en las asociaciones de endófitos de los distintos órganos de *T. wilfordii*, varias especies eran comunes a más de un órgano. En cambio, los análisis de diversidad obtenidos en la presente tesis doctoral reflejan que las comunidades presentes en las hojas, tallos y raíces de *N. tabacum* están bien definidas; diferencias en las asociaciones fúngicas también han sido documentadas en hojas y tallos de plantas leñosas como *Acer macrophyllum* Pursh (arce de oregon) (Sieber & Dorworth 1994), *Alnus rubra* Bong (aliso rojo) (Sieber et al. 1991), y

Quercus petraea (Matt.) Liebl. (roble albar) (Halmschlager et al. 1993). Esto podría deberse a que los tres órganos representan distintos sustratos para los endófitos y también a que pueden existir diferencias microclimáticas entre los órganos del mismo modo que ha sido sugerido para otras especies vegetales (Espinosa-García & Langenheim 1990), ambos factores son potencialmente determinantes de la distribución de los endófitos. En concordancia con lo previamente expuesto, Carroll & Petrini (1983) demostraron la existencia de diferencias en la utilización del sustrato entre endófitos de coníferas, lo que les permitió confirmar la especialización de los endófitos en las acículas y pecíolos.

La gran diversidad de endófitos en las hojas de tabaco y la especialización por órganos dentro de las comunidades de endófitos refuerzan la idea de que este grupo de especies representan una fuente de interacciones ecológicas pobremente estudiadas. Algunos géneros patógenos también incluyen especies saprótrofas, y algunas especies pueden ser primariamente saprótrofas y secundariamente patógenas. Por lo tanto, una amplia gama de asociaciones desde patogénicas hasta mutualísticas pueden ser encontradas dentro de la comunidad de endófitos presentes en las plantas de *N. tabacum*. Bajo estas circunstancias, es de trascendencia entender la distribución espacial y temporal de los endófitos al momento de evaluar la relevancia ecológica de estas asociaciones en las poblaciones vegetales. Por ejemplo, la posible naturaleza patogénica de algunos endófitos registrados en este estudio debería ser cuidadosamente considerada ya que algunas de las especies identificadas son capaces de atacar las hojas del tabaco, como *A. alternata*, que provoca la enfermedad de la mancha marrón (Jing et al. 2018). También, especies de *Fusarium* son conocidas por provocar fusariosis en plantas de tabaco produciendo marchitez generalizada y pérdidas en el rendimiento (Berruezo et al. 2018).

Las comunidades de hongos endófitos presentes en las hojas son de especial interés ya que estos órganos son los lugares donde se llevan a cabo principalmente la fotosíntesis y evapotranspiración y es donde los endófitos tienen que enfrentar las mayores fluctuaciones ambientales y en la dinámica bioquímica. Por esto, estudios más profundos son necesarios para descifrar las propiedades de estas comunidades de hongos presentes en las plantas de tabaco.

Este capítulo documenta las asociaciones de hongos endófitos presentes en raíces, tallos y hojas de *N. tabacum* expandiendo el conocimiento de la diversidad de hongos endófitos presentes en tejidos de la planta y provee bases para entender las relaciones entre estos hongos poco estudiados.

Algunos de los endófitos aislados son de particular interés y deberían de tenerse en cuenta ya que revisten importancia en la sanidad vegetal, por ejemplo algunas de las especies de *Fusarium* y *Alternaria* tienen la capacidad potencial de provocar enfermedades en las plantas de tabaco. Otro

punto interesante para seguir estudiando es ampliar los conocimientos sobre la ecología de los hongos endófitos que naturalmente se encuentran en el interior de las plantas de tabaco, ya que esto nos permitiría dilucidar aquellos factores que desencadenan el cambio de la relación endofítica a patogénica en este tipo de hongos.

CAPÍTULO 2

Aislamiento y caracterización de hongos entomopatógenos asociados al cultivo del tabaco en la Provincia de Jujuy, Argentina.



Objetivos

Realizar la prospección, detección y aislamiento de hongos entomopatógenos en los insectos plaga y suelos de cultivos de tabaco de la provincia de Jujuy.

Caracterizar las cepas aisladas morfológica y molecularmente, así como también por su capacidad biocida frente a plagas del cultivo de tabaco.

Introducción

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos patógenos de insectos presentes en todo tipo de ambientes, tanto naturales como aquellos perturbados por el hombre, pudiendo vivir de manera saprofítica en el suelo o existir también como endófitos en el interior de distintas especies vegetales o incluso exhibir características “micorrícicas” ya que, cuando se los encuentra en la rizósfera, transfieren nitrógeno desde los insectos a las plantas huésped (Behie et al. 2015). Su distribución es cosmopolita y se encuentran frecuentemente presentes en todo tipo de suelos, incluso en agroecosistemas de regiones templado- cálidas (Vega et al. 2009).

Las interacciones entre organismos sobre y debajo del suelo son reconocidas por su importancia en la estructuración de las comunidades de los ecosistemas terrestres. El entendimiento del funcionamiento de estas interacciones en los sistemas agrícolas podrían ayudar a la protección vegetal (van der Putten et al. 2009). Distintos estudios sobre entomopatógenos presentes en suelos han demostrado que algunas especies fúngicas, particularmente *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, son abundantes en suelos agrícolas, pero infrecuentes en suelos de ambientes no perturbados (Meyling & Eilenberg 2006; Vega et al. 2009). Por otro lado, no se ha esclarecido aun debido a que los estudios son escasos, si existe relación entre la abundancia local de hongos entomopatógenos debajo de la tierra en relación a aquellos que infectan insectos sobre el suelo en los ecosistemas. En este sentido, se ha demostrado que *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin presente en suelos, también se encuentra en la superficies de hojas y como patógeno latente en cadáveres de insectos en hábitats seminaturales (Meyling et al. 2009) indicando así que podrían existir interacciones entre el suelo y lo que ocurre sobre él. Además, Ormond et al. (2010) al estudiar ambientes de bosque, han reportado que *B. bassiana* se encontraba presente tanto en suelos como en el follaje. Por otro lado en los ecosistemas agrícolas, la ocurrencia espacio temporal de hongos entomopatógenos en suelos y sobre él, no ha sido extensamente estudiada, este tipo de

conocimiento permitiría comprender los nichos ecológicos que estos hongos ocupan en los agroecosistemas y así evaluar su potencial para regular insectos plaga. En este sentido, Hesketh et al. (2010) reconocen la necesidad de estudiar y develar la abundancia espacio-temporal y distribución de estos hongos debido al potencial impacto que podrían tener regulando las poblaciones de insectos y para el desarrollo de epizootias. Así, uno de los aspectos en los que es necesario profundizar particularmente en nuestro país, es en la ecología de cepas nativas de hongos entomopatógenos para poder predecir los impactos que las prácticas agrícolas podrían tener sobre las poblaciones.

A pesar de que existen estudios sobre los hongos entomopatógenos presentes en los agroecosistemas, se requiere llevar a cabo estudios más holísticos y principalmente determinar las especies presentes en Argentina, particularmente en la región del NOA. No existen en la actualidad registros de hongos entomopatógenos presentes en la provincia de Jujuy, ni de aquellos asociados al cultivo de tabaco, ni de su diversidad específica, tampoco sobre cómo estos podrían ser utilizados para disminuir el uso de agroquímicos.

La etapa inicial para el estudio y selección de cepas de hongos entomopatógenos para su posterior utilización en el control de plagas, constituye su caracterización tanto morfológica como molecular y enzimática.

El ADNr de los hongos filamentosos y levaduras está organizado como una unidad que se repite una detrás de la otra (en- tándem). Cada unidad incluye tres genes de ARNr, el gen que codifica para el 18S ARNr, el que codifica para el 5,8S ARNr y el gen que codifica para el 28S ARNr. En cada una de las unidades los genes están separados por dos secuencias espaciadoras internas que se transcriben junto a los genes del ARNr, denominadas ITS1 e ITS2 que comprenden unos 200 a 400 pares de bases, que no son codificantes. Cada unidad se encuentra separada por un espaciador intragénico (16S). En la determinación de especies fúngicas, estas regiones no codificantes del ADNr nuclear son de gran importancia ya que son más susceptibles a acumular mutaciones y por lo tanto tienen gran interés en la identificación de especies. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido que se amplifiquen estas regiones o fragmentos específicos del ADN utilizando oligonucleótidos (primers) complementarios a las regiones cercanas al fragmento de interés.

Los hongos entomopatógenos presentan caracteres morfológicos que frecuentemente son el resultado de evolución convergente, es por esto que en la actualidad las técnicas moleculares, no pueden omitirse en estudios sobre taxonomía, dada su utilidad para resolver problemas de clasificación. Las especies de entomopatógenos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* han sido caracterizadas molecularmente permitiendo la clasificación en especies y subespecies de numerosos

aislamientos, cepas, genotipos y patotipos; y revelando también las relaciones filogenéticas entre estos. El empleo de herramientas moleculares en la taxonomía fúngica ha sido de gran utilidad para entender relaciones filogenéticas entre hongos y a desarrollar una clasificación filogenética hasta el nivel de orden (Hibbett et al. 2007; Rehner & Buckley 2005). Para estudiar la diversidad génica de estos hongos y reconstruir filogenias, los marcadores más utilizados, además de los espaciadores internos transcritos (ITS), son aquellos que secuencian la región del factor de elongación 1-alpha (EF-1 α) y la región intergénica nuclear Bloc (Rehner & Buckley 2005).

El análisis de diversidad utilizando marcadores de microsatélites o secuencias simples repetidas (ISSR), es utilizado para inferir estructuras poblacionales y variabilidad genética (Enkerli & Widmer 2010). Los ISSR son secuencias repetidas en tándem de 1 a 6 nucleótidos que se encuentran dispersas en el genoma de la mayoría de los organismos. Los alelos de un locus particular pueden variar en el número de repeticiones de estas secuencias resultando en polimorfismos en la longitud de los alelos SSR. Los loci SSR se amplifican individualmente por PCR utilizando primers específicos para las secuencias de ADN que se encuentran al lado de los alelos SSR. Posteriormente, por electroforesis se determina el tamaño de los alelos. Los marcadores SSR son altamente polimórficos y se segregan de forma independiente, estos criterios son importantes para discriminar entre organismos emparentados y para realizar análisis de poblaciones genéticas (Avis 2004). Estos marcadores han sido caracterizados para varias especies de hongos entomopatógenos, por ejemplo para *B. bassiana* (Rehner & Buckley 2003), *M. anisopliae* (Enkerli et al. 2005; Oulevey et al. 2009) y *Paecilomyces fumosoroseus* (= *Isaria fumosorosea*) (Dalleau-Clouet et al. 2005). De este modo, constituyen una primera herramienta para la distinción de genotipos dentro de una misma especie de hongos entomopatógenos, siendo de utilidad para la selección de cepas con caracteres deseables, como patogenicidad y virulencia frente a plagas.

La taxonomía clásica implica la descripción morfológica de los hongos en la que se realizan estudios de sus estructuras macroscópicas (tasa de crecimiento de colonias, aspecto, color y textura de las mismas) y microscópicas (descripción de sus estructuras reproductivas como fiálides, conidóforos y conidios). A pesar de que en el pasado estos caracteres eran los únicos empleados en los estudios taxonómicos y filogenéticos, se sabe en la actualidad que no permiten discriminar a nivel intraespecífico ni tampoco son suficientes para estudios de relaciones filogenéticas entre grupos. Por este motivo es que técnicas morfológicas y moleculares son complementarias cuando se quiere realizar la identificación de cepas fúngicas y analizar su variabilidad.

El mecanismo a través del cual los hongos entomopatógenos han adquirido la capacidad para matar artrópodos (insectos, garrapatas, arañas y ácaros) permanece aún sin revelar, sin embargo las cepas han desarrollado diferentes niveles de especificidad y virulencia (Butt et al.

2016). Los estudios filogenéticos sugieren que a pesar de que el proceso de penetración y desarrollo dentro de los huéspedes es similar, la capacidad de infectar artrópodos por parte de estos hongos surgió independientemente varias veces durante la evolución de los hongos, por lo que se trataría de un carácter convergente (Zheng et al. 2013). Los estudios utilizando datos genómicos revelan que los hongos entomopatógenos difieren entre ellos en los distintos mecanismos de infección (Xiao et al. 2012). Así, los artrópodos y los entomopatógenos exhiben una gran plasticidad en su coevolución, adaptándose a contrarrestar las estrategias del otro y desarrollando algún mecanismo en respuesta a estas.

En síntesis, los estudios relativos a la ocurrencia natural y diversidad de hongos entomopatógenos en los agroecosistemas son necesarios para un mejor entendimiento de la dinámica fúngica en estos sistemas, además de su utilización como potenciales controladores de plagas (Sun & Liu 2008).

Por lo expuesto anteriormente, en el presente capítulo se investigó la ocurrencia natural de hongos entomopatógenos presentes, tanto en suelo como causando infecciones naturales en insectos en fincas tabacaleras de la provincia de Jujuy, Argentina. Luego, se realizó su caracterización morfológica y molecular y se estudió la diversidad a nivel génico. Por último se estableció la patogenicidad de estas cepas frente a plagas del tabaco.

Materiales y Métodos

Recolección de insectos y detección de infecciones

Se muestrearon 7 fincas tabacaleras en dos temporadas (Agosto y Diciembre 2014) (Figura II-1; Tabla II-1). Se realizó la prospección de insectos fitófagos con signos de infección fúngica, para ello, se seleccionaron 5 parcelas por finca (10 x 10 metros cada una), en las cuales se revisaron 10 plantas mediante un muestreo al azar, teniendo en cuenta que las unidades muestrales abarquen tanto la periferia como el centro del lote donde se encuentra el cultivo (Figura II-2).

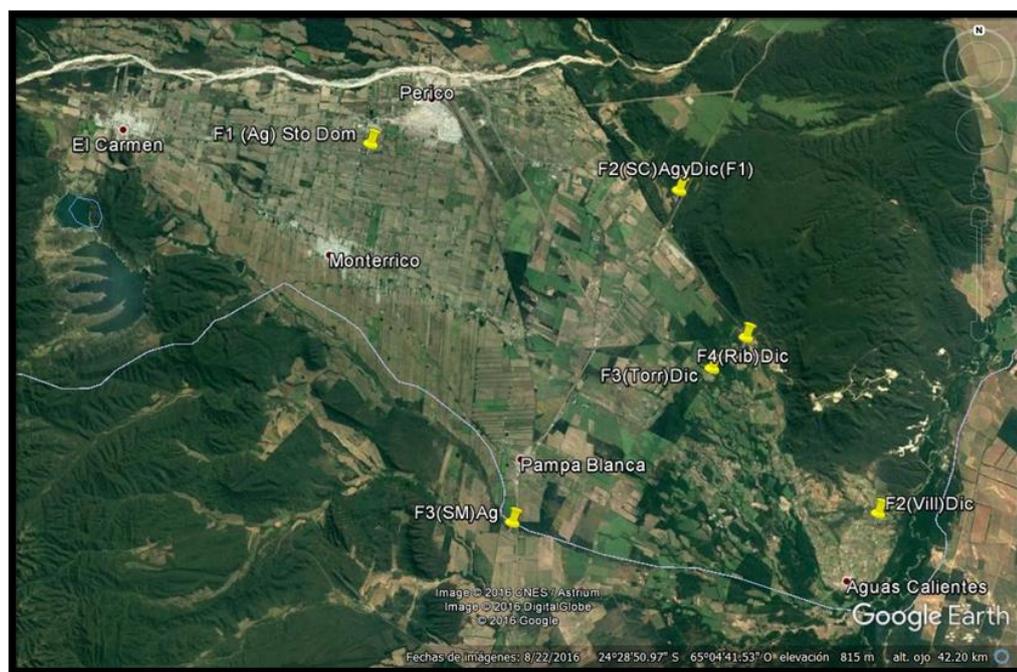


Figura II-1: Puntos de muestreo en las fincas tabacaleras de la provincia de Jujuy.

Tabla II-1: Localización geográfica de los puntos de muestreo

Fecha	Localidad	Ubicación Geográfica	msnm	
Agosto	Finca 1	Sto Domingo	24°24'02,04'' S/ 65°08'55,24'' O	981
	Finca 2	Las Pampitas	24°25'14,44'' S/ 65°01'14,81'' O	796
	Finca 3	Saladillo	24°33'48,63'' S/ 65°04'58,79'' O	744
Diciembre	Finca 1	Las Pampitas	24°25'8,3'' S/ 65°01'26,8'' O	796
	Finca 2	Aguas Calientes	24°33'37,1'' S/ 64°54'36,8'' O	610
	Finca 3	Torrecillas	24°29'50,8'' S/ 64°59'19,6'' O	584
	Finca 4	Puesto Viejo6	24°29'02,6'' S/ 64°58'21,7'' O	706

Recolección de muestras de suelo

A su vez, en cada una de las fincas y en cada una de las 5 parcelas por finca, se tomaron muestras compuestas de suelo de una profundidad no mayor a 12 cm (Figura II-2). Para ello se utilizó una pala que se desinfectó con alcohol 70% (v/v) previo a su uso para recolectar la siguiente

muestra. Cada muestra, se subdividió en tres sub-muestras que se colocaron por separado en bolsas de polipropileno estériles y que fueron mezcladas y almacenadas a 4°C hasta su posterior procesamiento en el laboratorio.



Figura II-2: Recolección de muestras de suelo y prospección de insectos infectados en las fincas tabacaleras.

Aislamiento de hongos entomopatógenos en laboratorio

El aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de muestras de suelo se realizó utilizando la técnica de aislamientos monospóricos por dilución seriada (Lecuona 1996). Esta técnica consistió en colocar en Erlenmeyer (250 ml) 10 gr de la muestra de suelo y 10 ml de agua destilada estéril, que se agitó durante cinco minutos con agitador magnético y se la dejó reposar durante media hora. Se tomó 1 ml del sobrenadante obtenido, que se transfirió a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril (ADE) y se agitó mediante vórtex durante un minuto. Siguiendo este procedimiento, se realizaron seis diluciones seriadas con ADE. Posteriormente de cada una de ellas, se tomaron 100 μ l que se sembraron en Cápsulas de Petri conteniendo medio de cultivo selectivo según Posadas et al. (2012) (Oatmeal agar + CTAB + cloranfenicol) y se distribuyeron uniformemente en la caja mediante un ansa de Drigalsky. Las cajas fueron incubadas a 24°C en oscuridad por 10 días hasta la emergencia de las colonias fúngicas de interés. Las colonias que crecieron fueron observadas bajo lupa binocular para realizar una primera selección y luego proceder a su purificación. Para esto último, bajo cámara de flujo laminar y utilizando un ansa

estéril se tomaron muestras de las colonias que se transfirieron a cajas conteniendo medio de cultivo (APG). Una vez crecidas y esporuladas, se realizaron preparaciones microscópicas montadas en azul de algodón- lactofenol de Ammann (Humber 1997) para poder confirmar su identidad al observar estructuras vegetativas y reproductivas.

Para cada uno de los aislamientos, se obtuvieron colonias monospóricas, seleccionando una unidad formadora de colonias al azar, a partir de cajas que previamente habían sido inoculadas con una solución de conidios de concentración 1×10^6 , para su almacenamiento y depósito en la Colección Micológica del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini (LPSc) FCNyM, UNLP.

Identificación de las especies fúngicas

Identificación morfológica

Se estudiaron las tasas de crecimiento, la producción y germinación de conidios de los aislamientos obtenidos.

Ensayos de crecimiento radial

El crecimiento radial de las colonias fúngicas se evaluó a diferentes temperaturas (10, 24 y 30 °C) (Figura II-3). A partir de cultivos de una semana de crecimiento se obtuvieron discos de 5mm de diámetro que se colocaron en el centro de cajas de Petri conteniendo APG. Para cada una de las temperaturas a evaluar y para cada una de las cepas se realizaron 5 repeticiones, que se incubaron a las distintas temperaturas en oscuridad durante 14 días. Diariamente, mediante regla milimetrada, se registró la medida de dos ejes ortogonales que se promediaron, para calcular el diámetro de crecimiento de cada colonia. La tasa de crecimiento radial del micelio para cada cepa y a cada una de las temperaturas, se estimó en mm/día, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{(\text{diámetro final/diámetro inicial})}{\text{días de incubación}}$$

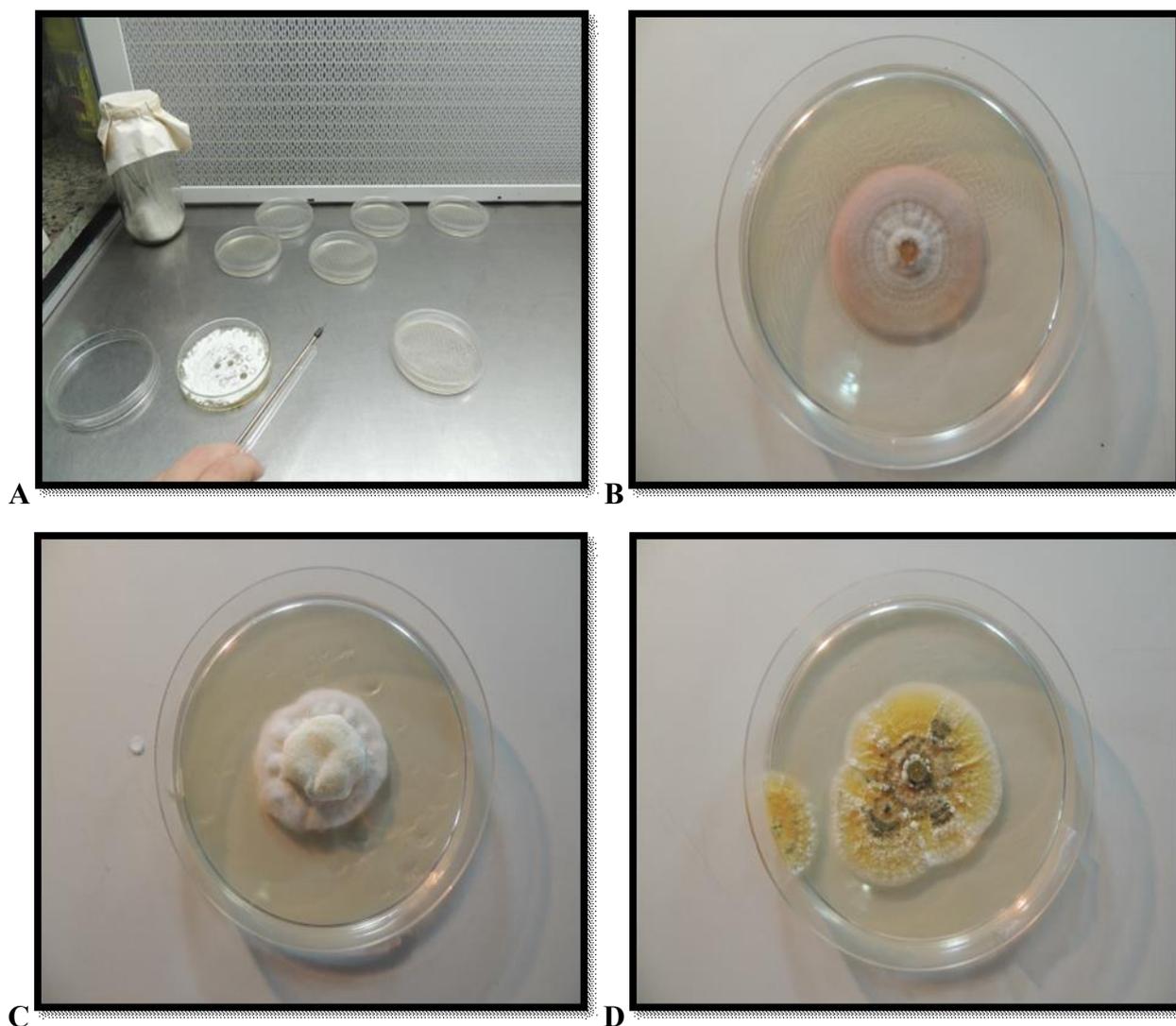


Figura II-3: A-Ensayo de crecimiento radial. B- Colonia de *Purpureocillium lilacinum* C-Colonia de *Beauveria bassiana* D-Colonia de *Metarhizium anisopliae*.

Producción y germinación de conidios

Al finalizar el ensayo de crecimiento radial, las colonias fueron utilizadas para determinar la producción y germinación de conidios.

La producción de conidios se estimó mediante el protocolo de Ayala-Zermeño et al. (2015): se agregaron 10 ml de Tween 80 (0,05 %, v/v) a las cajas de Petri con las colonias de 14 días de crecimiento. Se raspó suavemente la superficie de las colonias con un ansa de Drigalski para suspender los conidios en la solución. La suspensión resultante fue colocada en tubos estériles que fueron agitados en vórtex por 5 minutos, esto permitió determinar la concentración de conidios con cámara de Neubauer, de cada una de las cepas y para cada una de las temperaturas estudiadas (Figura II-4).

El porcentaje de germinación de conidios se determinó colocando 0,5 ml de APG en portaobjetos que fueron inoculados con 50 μ l de solución de conidios con una concentración de 10^6 conidios/ml que se distribuyó uniformemente con una ansa de Drigalski sobre una delgada lámina de medio de cultivo de acuerdo a la metodología propuesta por Ayala-Zermeño et al. (2015). Los portaobjetos con la solución inoculada se mantuvieron en cámara húmeda a 24°C en oscuridad por 24 hs. La germinación de conidios fue registrada por observación bajo microscópico óptico, se contabilizaron 100 conidios en cada una de las tres repeticiones realizadas para cada aislamiento. Se consideraron germinados aquellos conidios que presentaron tubos germinales de una longitud mayor al diámetro de los conidios sin germinar (Butt & Goettel 2000).



Figura II-4: Ensayo de producción y germinación de conidios.

Identificación molecular

Extracción del ADN fúngico

La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos fúngicos crecidos en medio de cultivo líquido (PDA). El micelio se recolectó a los 7 días post-incubación en estufas a 25°C y oscuridad. Para la extracción se siguió la metodología desarrollada por Aljanabi & Martinez (1997) y la calidad de ADN fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa 0,7% (p/v) suplementado con Bromuro de etidio (100 ng ml^{-1}). La cantidad de ADN fue estimada por comparación con el

marcador de peso molecular de concentración conocida del genoma del fago Lambda digerido con la enzima Hind III (Promega Biotech) usando un analizador de imágenes (SYNGENE GeneTools).

Análisis de diversidad

Se seleccionaron 3 marcadores ISSR de acuerdo a los estudios desarrollados por Toledo et al. (2018) (Tabla II-2). El análisis se realizó con 11 aislamientos de *B. bassiana* y 8 aislamientos de *P. lilacinum*. Las reacciones de amplificación incluyeron un control libre de ADN y fueron llevadas a cabo en un volumen total de reacción de 15 ml, conteniendo Buffer de reacción 1 X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 a 25°C; 1% Triton X-100), 2 mM (*primers* KA5 y 826) o 2,5 mM (primer BA3) o MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 50 ng de cada primer, 1 Unidad de Taq ADN polimerasa y aproximadamente 50 ng de molde de ADN (reactivos Inbio Highway, Tandil, Buenos Aires, Argentina). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador MJ Research (PTC-150 MiniCycler) programado de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, *annealing* a 48°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 3 minutos, con un paso adicional de extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v) suplementado con Bromuro de etidio (100 ng mL⁻¹) usando como control standard el marcador de peso molecular escalonado 100–1000 bp (Inbio Highway, Tandil, Buenos Aires, Argentina). El patrón de bandas generado por ISSR fue estudiado con el software Past3 y se construyó un dendrograma usando la matriz de similaridad de DICE y UPGMA.

Tabla II-2: Marcadores ISSR utilizados en el análisis de diversidad.

Marcador	Secuencia
CA5	CAT(ACA)5
BA3	(AC)8CT
826	AC(CA)6CC

Identificación molecular

A partir del dendrograma generado en el análisis de diversidad se seleccionaron 8 aislamientos para confirmar su identidad mediante la amplificación y secuenciación de los genes ITS y TEF. La selección se realizó teniendo en cuenta la ubicación de los aislamientos en el dendrograma. Las cepas seleccionadas fueron LPSc 1213, LPSc 1216, LPSc 1363 y LPSc 1364 de *B. bassiana* y las cepas LPSc 1370, LPSc 1371, LPSc 1373 y LPSc 1374 de *P. lilacinum*.

Para amplificar la región del ITS se utilizaron los *primers* universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y para amplificar el TEF los *primers* 983F (5'-GCYCCYGGHCA YCGTGAYTTYAT-3') y 2218R (5'-ATGACACCRACRGCRCRGTGTG-3'). El programa de PCR consistió de un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos; seguido por 33 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, 45 segundos a 56°C para ITS y 1 minuto a 48°C para TEF, 1 minuto a 72°C y un paso de elongación inicial a 72°C por 5 minutos. La mix de reacción contenía 1 X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 a 25°C; 1% Triton X-100), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 50 ng de cada *primer*, 1 Unidad de Taq ADN polimerasa y aproximadamente 20 ng de molde de ADN (reactivos Inbio Highway, Tandil, Buenos Aires, Argentina). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un ciclador MJ Research (PTC-150 MiniCycler) (Figura II-5).

Los fragmentos amplificados se precipitaron en un volumen de isopropanol y 0,1 volúmenes de acetato de amonio 3 M. La mezcla fue incubada a -18°C durante 12 h y luego centrifugada a 15,000g por 15 minutos. El pellet de DNA fue lavado con etanol 70%, secado y disuelto en agua destilada estéril. Los amplicones fueron enviados para su secuenciación al Instituto CERELA-CONICET (Tucumán, Argentina) de acuerdo al método descrito por Sanger et al. (1977). Las secuencias fueron editadas usando el programa BioEdit version 7.0.5 (Hall 1999) y luego analizadas en la base de datos de genes GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov).



Figura II-5: Equipamiento e instrumental utilizado para la caracterización molecular de las cepas estudiadas.

Patogenicidad de los aislamientos.

Los bioensayos se llevaron a cabo utilizando larvas del tercer estadio del lepidóptero plaga *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) y adultos del coleóptero *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) ambos reportados como importantes plagas del cultivo de tabaco (Mercado -Cárdenas 2013).

En el bioensayo de patogenicidad frente a *H. gelotopoeon*, se utilizaron larvas del tercer estadio del lepidóptero, provistas por la empresa AgIdea que fueron criadas desde su eclosión hasta el estadio de interés con dieta artificial (Patana 1977). Para comprobar la patogenicidad frente a *D. speciosa* se utilizaron insectos colectados a campo y mantenidos en laboratorio durante 15 días para descartar cualquier enfermedad proveniente del campo (Pilz et al. 2007).

A partir de los aislamientos obtenidos, se repicaron las colonias en cajas de Petri conteniendo APG, que fueron mantenidas en condiciones controladas (24°C y oscuridad) durante 14 días para promover su crecimiento y esporulación. Se obtuvieron los conidios de las colonias de cada una de las cepas mencionadas anteriormente, raspando suavemente con un ansa la superficie de las cajas a las que se les adicionaron 10ml de Tween 80 (Merck®) al 0,01 %. Las suspensiones de conidios se filtraron a través de gasas estériles para separar restos de micelio y para su posterior homogeneización se las agitó en un vórtex durante 1 minuto. La concentración de conidios se

determinó para cada cepa mediante Cámara de Neubauer y se ajustó la suspensión a 1×10^8 conidios/ml según Gurulingappa et al. (2011).

Para cada tratamiento los insectos de las dos especies, fueron inoculados con una suspensión de conidios de concentración ajustada. Se empleó el método de inmersión, de acuerdo a Nussenbaum & Lecuona (2012) para inocular las cepas fúngicas, este consistió en sumergir por 15 segundos los insectos en las soluciones antes mencionadas. Se utilizó papel de filtro estéril para remover el exceso de humedad, luego los insectos fueron colocados individualmente en recipientes plásticos que se colocaron en cámaras de cría (Semedix SA.) bajo condiciones controladas (25 ± 2 °C y 70% HR, con un fotoperíodo de 14:10 L: O). Se les proveyó alimento diariamente, en el caso de las larvas de *H. gelotopoeon* se utilizó dieta artificial (Patana 1977) y a los adultos de *D. speciosa* se les administraron piezas de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^3$ de *Cucurbita máxima* (zapallito) (Pecchioni 1988). Se realizaron tres réplicas de diez individuos cada una para cada uno de los tratamientos, los controles fueron tratados con una solución de Tween 80 libre de conidios (Figuras II-6 y II-7).

Se registró el número de larvas y adultos muertos diariamente durante 14 días. Para confirmar la mortalidad por micosis, los insectos muertos fueron colocados en cámara húmeda e incubados a 24°C en oscuridad por una semana (Figura II-6 y II-7).

Se calculó el porcentaje de mortalidad para cada aislamiento, cuando este superó el 50% se estimó el tiempo medio de supervivencia para cada tratamiento a través de la función de distribución de supervivencia de Kaplan-Meier mediante el software Xlstat life 2018. La significancia de las diferencias entre las curvas de supervivencia se confirmó mediante el test de log-rank.

Las diferencias entre los porcentajes de mortalidad se estimaron mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía para comparar la virulencia de las cepas estudiadas frente a los insectos. Para la posterior separación de tratamientos se realizó un test a posteriori (Test de Tukey, $p < 0,05$). Los datos, expresados en porcentajes, se transformaron a la función arcoseno. Previo a la aplicación del test paramétrico se corroboró el cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianzas y de la normalidad de los errores. Los datos fueron analizados utilizando el software InfoStat versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011).

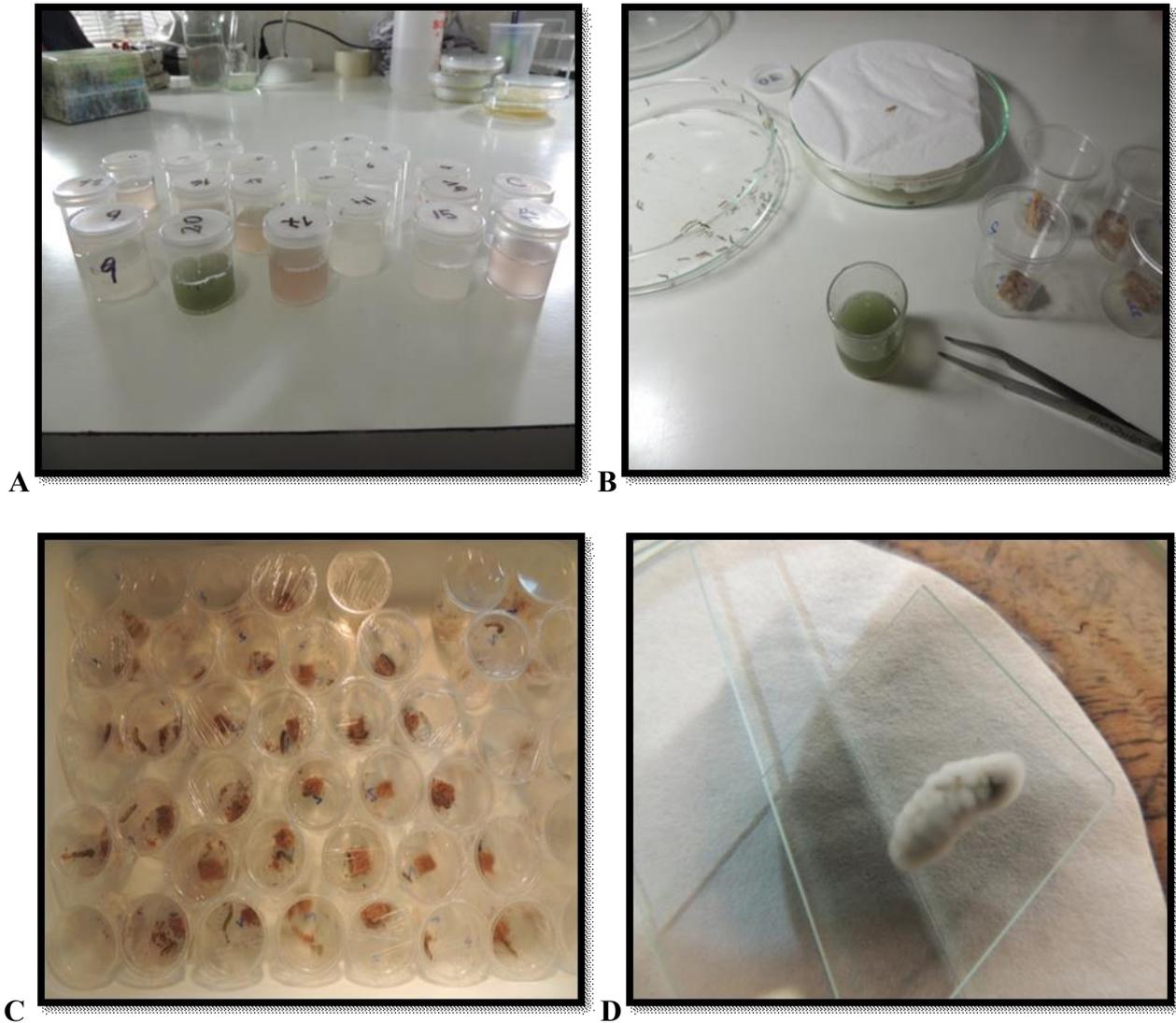


Figura II-6: Ensayo de patogenicidad frente a larvas de *Helicoverpa gelatopoeon*. A-Suspensiones de conidios de hongos entomopatógenos. B-Método de inmersión de los insectos. C-Preservación de las larvas tratadas en cámaras de cría. D-Larva en cámara húmeda, con desarrollo de micosis.

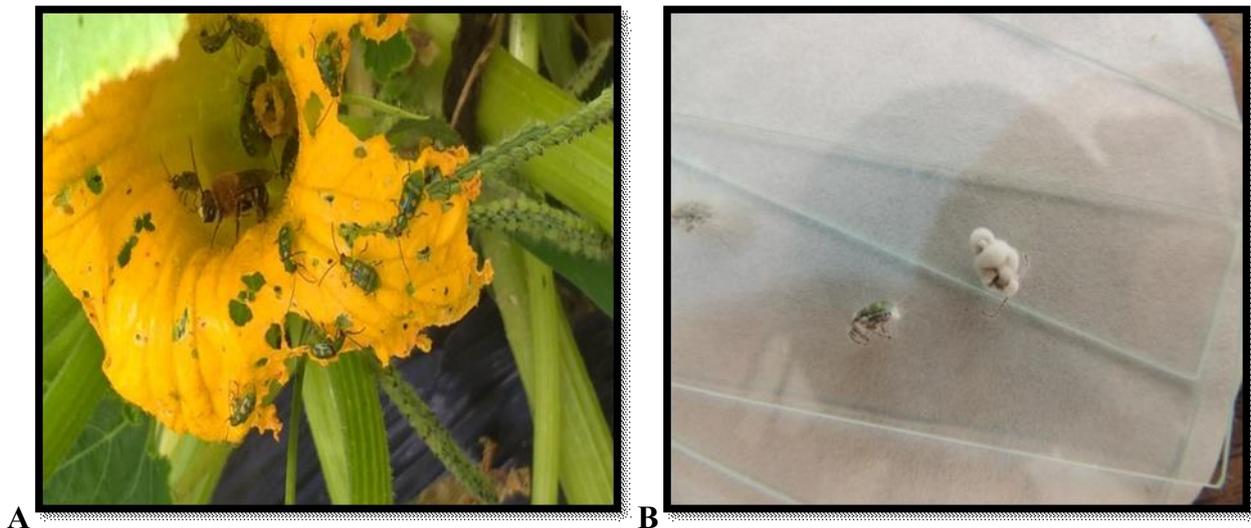


Figura II-7: Ensayo de patogenicidad frente a adultos de *Diabrotica speciosa*. A- Insectos en campo. B- adultos de *Diabrotica speciosa* cubiertos por el hongo *Beauveria bassiana* una vez colocados en cámara húmeda

Resultados

Hongos entomopatógenos aislados

En los muestreos realizados, no se registraron insectos infectados por hongos entomopatógenos, por lo que la totalidad de las cepas que se estudiaron en este capítulo fueron aquellas que pudieron aislarse de los suelos de las fincas tabacaleras de la provincia de Jujuy.

A partir de las muestras de suelo se aislaron 20 cepas de hongos entomopatógenos, de las cuales 11 correspondieron a la especie *B. bassiana*, 8 a *P. lilacinum* y 1 a *M. anisopliae*. Las cepas obtenidas fueron depositadas en la colección micológica del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini (LPSc) (Tabla II-3; Figura II-8).

Tabla II-3: Aislamientos de hongos entomopatógenos asociados al cultivo de tabaco en la provincia de Jujuy.

Fecha	Finca	<i>B. bassiana</i>	<i>P. lilacinum</i>	<i>M. anisopliae</i>
Agosto	1	0	0	0
	2	2	0	0
	3	1	0	0
Diciembre	1	2	4	0
	2	2	1	0
	3	1	1	0
	4	3	2	1
Total		11	8	1

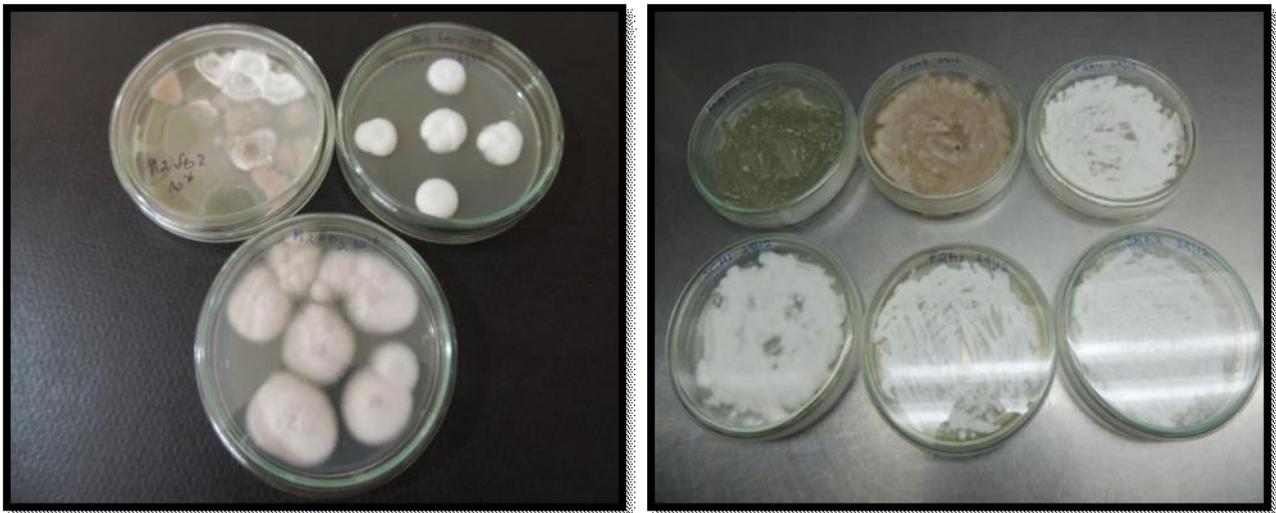


Figura II-8: Entomopatógenos aislados de suelo.

Caracterización morfológica

A continuación se describen características de las 3 especies de hongos halladas (Figura II-9)

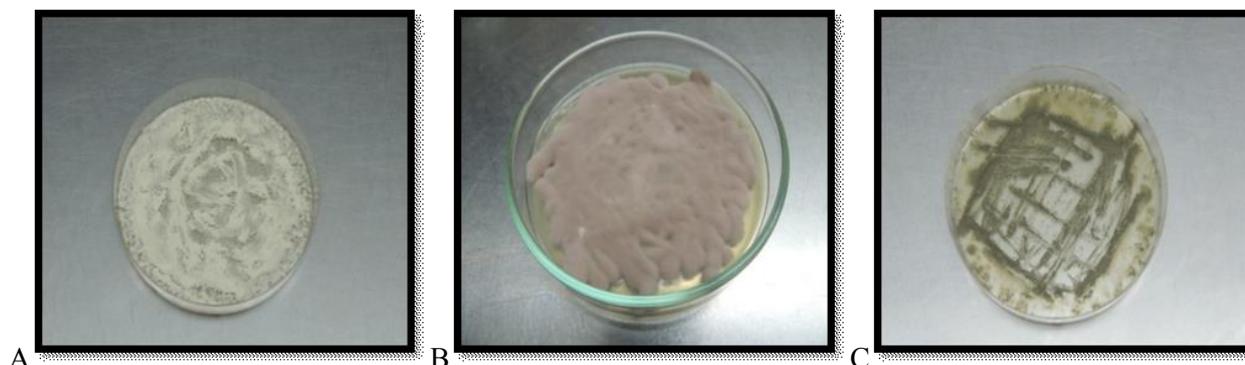


Figura II-9: Entomopatógenos presentes en suelos de fincas tabacaleras de la provincia de Jujuy **A-** *Beauveria bassiana*; **B-** *Purpureocillium lilacinum*; **C-** *Metarhizium anisopliae*.

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. (Figura II-9 A)

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

El micelio fúngico presentó un aspecto pulverulento de coloración blanco, que en todos los casos desarrolló un exudado transparente. El reverso de las colonias mostró una pigmentación de color amarillo pálido en todos los aislamientos. La esporulación se observó entre el quinto y el séptimo día de incubación a 24 °C en condiciones de oscuridad. En observación microscópica, los conidióforos se mostraron agrupados en racimos, con fiálides con parte basal dilatada terminando en un raquis en zig-zag, los conidios presentaron forma globosa a subglobosa.

En cuanto al crecimiento radial de las colonias, estas presentaron un crecimiento relativamente rápido a 24°C y 30°C. Los diámetros promedio de las distintas cepas de *B. bassiana* a los 14 días de incubación y en oscuridad a cada una de las temperaturas evaluadas se muestran en la Tabla II-4, II-5 y II-6. A 10°C, el mayor diámetro lo exhibió la cepa LPSc 1213 que alcanzó los 18,9±0,7 mm y el menor la cepa LPSc 1212 (13,2±0,8mm). A 24°C, la cepa LPSc 1216 alcanzó los 41,6±0,5 mm siendo así la de mayor diámetro y la cepa LPSc 1363 registró el menor valor

(27,9±0,07 mm). Por último, a 30°C la cepa LPSc 1214 presentó el mayor diámetro (34,8±0,8 mm) y el menor lo presentaron las cepas LPSc 1364 y 1213 (23,1±1,4 y 23,2±1,3 mm respectivamente)

Respecto a las tasas de crecimiento, se registraron diferencias significativas entre las distintas cepas a 10°C (F: 19,73; g.l:10; p<0,0001), a 24°C (F: 31; g.l: 10 p<0,0001) y a 30°C (F: 67,14; g.l: 10; p<0,0001). A 10°C, la mayor tasa de crecimiento fue la que presentó la cepa LPSc 1213 (0,99±0,05 mm/día) y el menor la cepa 1212 (0,58±0,06 mm/día). La cepa LPSc 1216 fue la que a 24°C exhibió la mayor tasa de crecimiento (2,61±0,04 mm/día) y la cepa LPSc 1363 la menor (1,63±0,05 mm/día). Finalmente, la cepa LPSc 1214 mostró una tasa de crecimiento de 2,13±0,06 mm/día a 30 °C y las cepas LPSc 1364 y LPSc 1213 las menores (1,29±0,1 y 1,3±0,1 mm/día respectivamente) (Figuras II-10, II-11 y II-12).

Tabla II-4: Diámetro de las colonias y Tasas de crecimiento de los aislamientos de *Beauveria bassiana* a 10°C (media±EEM). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas según Tukey (p<0,05).

LPSc	Diámetro de la colonia (mm)	Tasa de crecimiento (mm/d)
1210	15± 1	0,71±0,08 bc
1211	16,7±0,7	0,84±0,05 cd
1212	13,2±0,8	0,58±0,06 a
1213	18,9±0,7	0,99±0,05 e
1214	15±0,7	0,71±0,05 abc
1215	15,5±0,5	0,75±0,04 bc
1216	17,6±1,5	0,9±0,11 de
1217	13,8±0,3	0,63±0,02 ab
1363	15,4±0,7	0,74±0,05 bc
1364	16,6±0,9	0,83±0,06 cd
1365	14,8±0,8	0,7±0,06 ab

Tabla II-5: Diámetro de las colonias y Tasas de crecimiento de los aislamientos de *Beauveria bassiana* a 24°C (media±EEM). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas según Tukey ($p<0,05$).

LPSc	Diámetro de la colonia (mm)	Tasa de crecimiento (mm/d)
1210	30,2±0,8	1,8±0,06 a
1211	41,2±1,9	2,59±0,14 cd
1212	39,8±0,8	2,49±0,06 cd
1213	28,2±0,8	1,66±0,05 a
1214	32,1±0,7	1,94±0,05 ab
1215	31,2±0,65	1,87±0,47 a
1216	41,6±0,5	2,61±0,04 d
1217	40,2±1,3	2,51±0,09 cd
1363	27,9±0,7	1,63±0,05 a
1364	28,6±1,9	1,69±0,14 a
1365	36,6±0,5	2,26±0,04 bc

Tabla II-6: Diámetro de las colonias y Tasas de crecimiento de los aislamientos de *Beauveria bassiana* a 30°C (media±EEM). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas según Tukey ($p<0,05$).

LPSc	Diámetro de la colonia (mm)	Tasa de crecimiento (mm/d)
1210	24,4±2,1	1,39±0,15 ab
1211	26,3±1,2	1,52±0,09 b
1212	33,2±0,8	2,01±0,06 cd
1213	23,2±1,3	1,3±0,1 a
1214	34,8±0,8	2,13±0,06 d
1215	25,7±1	1,48±0,07 ab
1216	33,8±1,6	2,05±0,11 cd
1217	33,2±0,8	2,01±0,06 cd
1363	24,9±1,1	1,42±0,08 ab
1364	23,1±1,4	1,29±0,1 a
1365	31,6±1,3	1,9±0,09 c

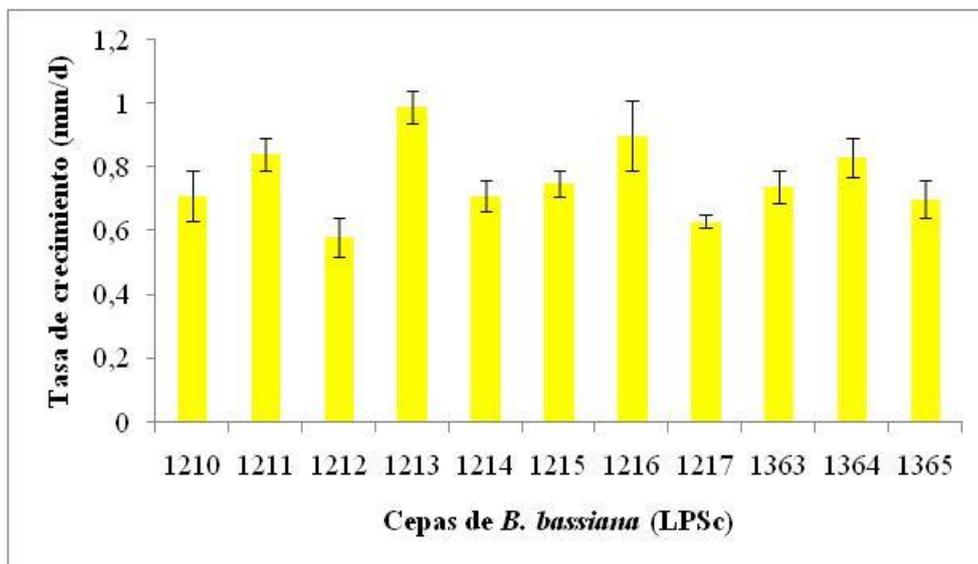


Figura II-10: Tasa de crecimiento de las diferentes cepas de *Beauveria bassiana* a 10°C.

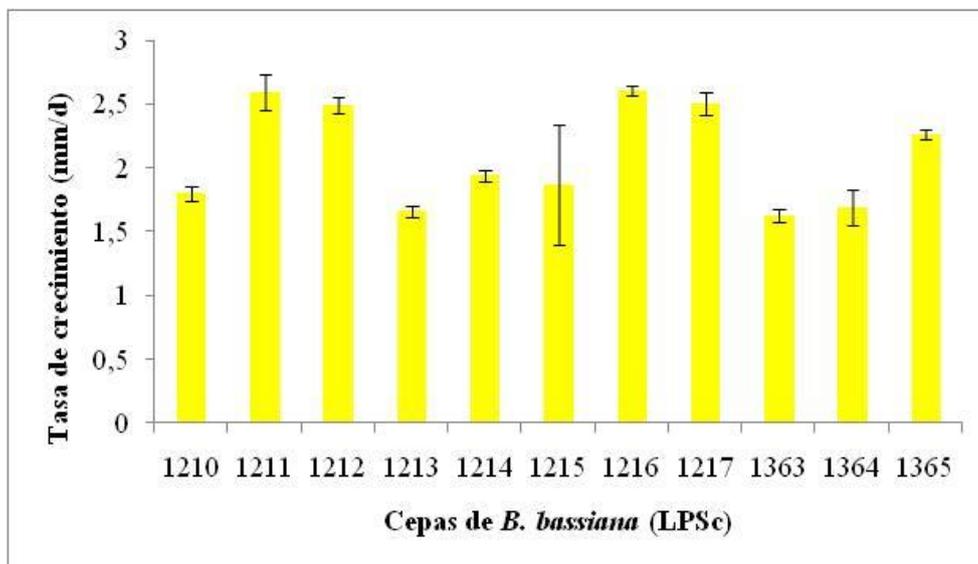


Figura II-11: Tasa de crecimiento de las diferentes cepas de *Beauveria bassiana* a 24°C.

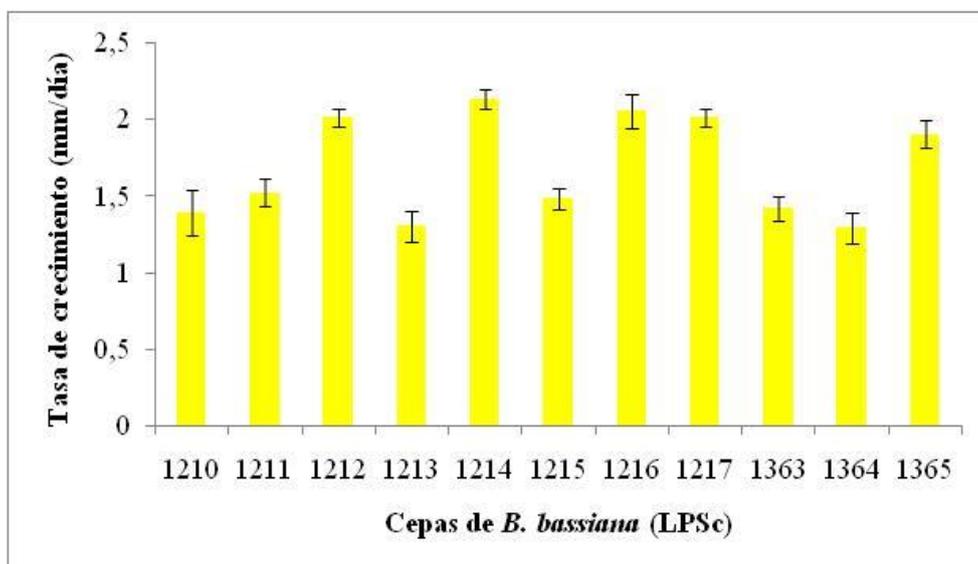


Figura II-12: Tasa de crecimiento de las diferentes cepas de *Beauveria bassiana* a 30°C.

La producción de conidios en cada una de las temperaturas evaluadas, fue significativamente diferente para las distintas cepas de *B. bassiana*, a 10°C $F=24,53$; g.l.=10; $p<0,0001$, a 24°C $F=256,85$; g.l.=10; $p<0,0001$ y a 30°C $F=189,75$; g.l.=10; $p<0,0001$ (Figuras II-13, II-14 y II-15 respectivamente). Siendo a 10°C la cepa LPSc 1213 la que mayor cantidad de conidios produjo y a 24 y 30°C la cepa LPSc 1215 presentó los mayores valores de producción.

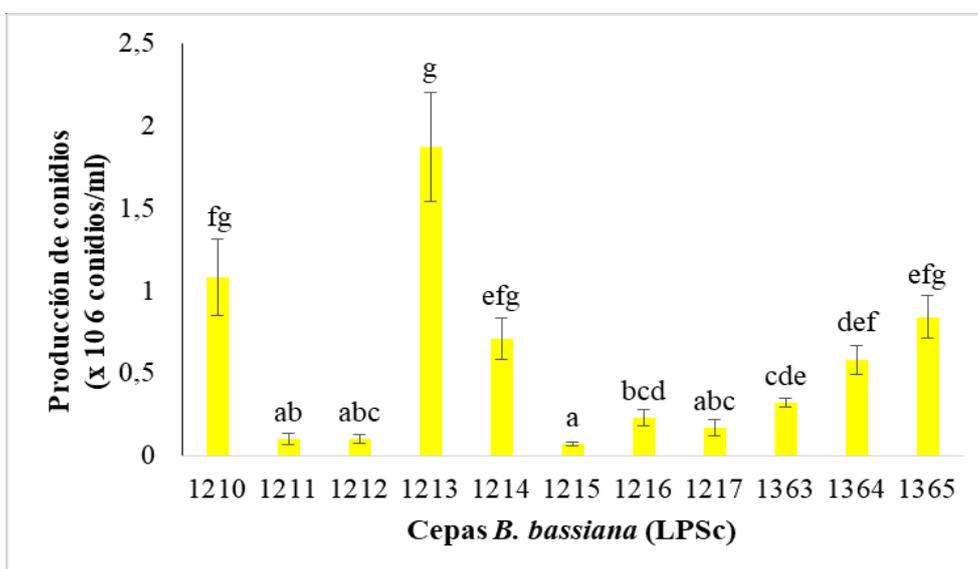


Figura II-13: Producción de conidios de las diferentes cepas de *Beauveria bassiana* a 10°C. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p<0,05$).

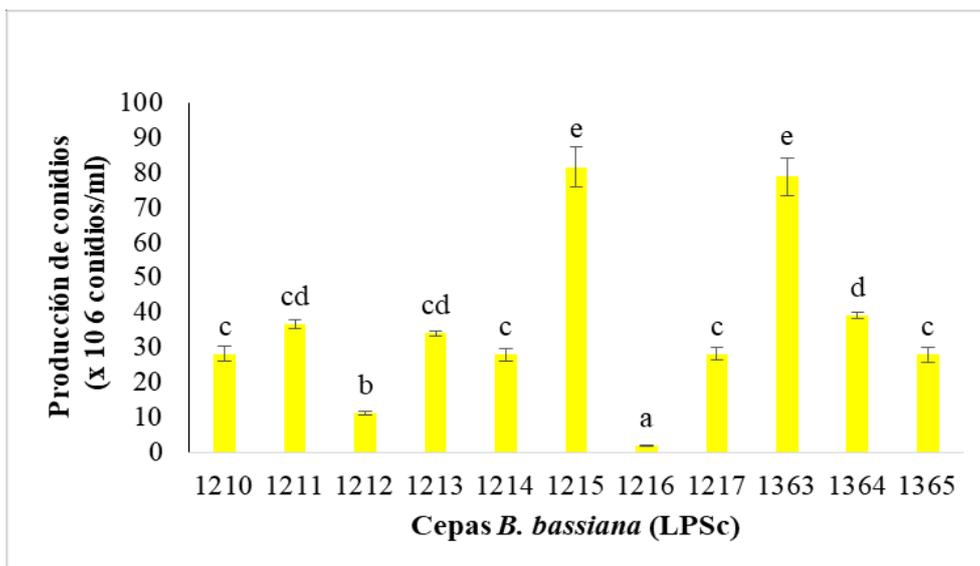


Figura II-14: Producción de conidios de las diferentes cepas de *Beauveria bassiana* a 24°C. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$).

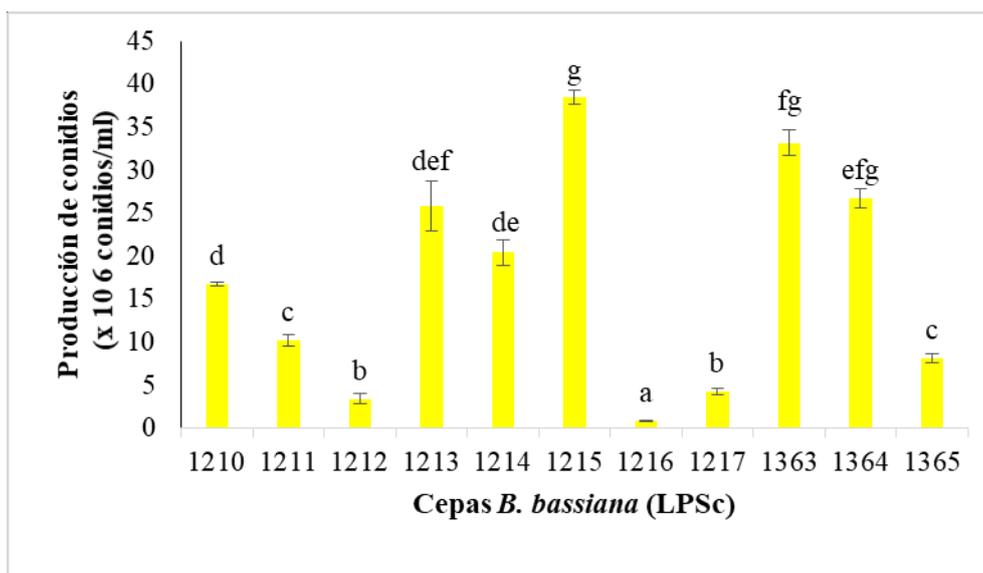


Figura II-15: Producción de conidios de las diferentes cepas de *Beauveria bassiana* a 30°C. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$).

La viabilidad de los conidios se calculó como el porcentaje de germinación de los mismos en las tres temperaturas evaluadas (Tabla II-6). Existieron diferencias significativas entre los aislamientos en todos los casos (a 10°C $F=4,8$; $g.l.=10$; $p=0,0001$, a 24°C $F=9,52$; $g.l.=10$; $p < 0,0001$ y a 30°C $F=9,4$; $g.l.=10$; $p < 0,0001$). A 10°C las cepas LPSc 1215 y LPSc 1364 mostraron los mayores porcentajes de germinación ($99,2\% \pm 0,84$ y $99,4\% \pm 0,89$ respectivamente), el menor valor fue para la cepa LPSc 1363 ($89,6\% \pm 1,14$). A 24°C la cepa LPSc 1215 alcanzó el $100\% \pm 0,00$ de

germinación, en cambio el menor valor fue obtenido para la cepa LPSc 1363 con un $90,8\% \pm 0,84$. Por otro lado a 30°C las cepas LPSc 1215 y LPSc 1364 obtuvieron el $99\% \pm 0,71$ y $99\% \pm 1$ respectivamente siendo estos los valores más elevados, en cambio la cepa LPSc 1363 obtuvo el menor con un $90\% \pm 2,3$.

Tabla II-6: Porcentaje de germinación de conidios de las distintas cepas de *Beauveria bassiana* (LPSc) a 10, 24 y 30°C (media \pm DE). Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,005$).

LPSc	% de Germinación		
	10°C	24°C	30°C
1210	97,8 \pm 1,3 bc	98,6 \pm 1,14 b	98,6 \pm 1,14
1211	97,8 \pm 1,3 bc	99,2 \pm 1,3 b	98,4 \pm 1,52 c
1212	96,6 \pm 2,61 bc	97,4 \pm 2,88 b	95,8 \pm 2,39 bc
1213	96,6 \pm 2,61 bc	97,6 \pm 2,07 b	98,6 \pm 1,14 c
1214	98 \pm 1,58 bc	99,8 \pm 0,45 b	98 \pm 1,58 c
1215	99,2 \pm 0,84 c	100 \pm 0,00 b	99 \pm 0,71 c
1216	95,2 \pm 2,28 abc	97,4 \pm 2,41 b	96,6 \pm 2,88 bc
1217	97,4 \pm 1,82 bc	96,2 \pm 2,77 b	93,4 \pm 3,21 ab
1363	89,6 \pm 1,14 a	90,8 \pm 0,84 a	90,6 \pm 2,3 a
1364	99,4 \pm 0,89 c	99,6 \pm 0,55 b	99 \pm 1 c
1365	92,6 \pm 8,26 ab	96,2 \pm 3,03 b	97,8 \pm 1,92 c

Purpureocillium lilacinum (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson 2011 (Figura II-9 B)

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Ophiocordycipitaceae

El micelio fúngico presentó aspecto denso y de color blanco al comienzo, con el transcurrir de los días y al madurar los conidios se presentó de color violáceo. El reverso de las colonias mostró una pigmentación de color blanco-amarillo-violáceo en todos los aislamientos. El inicio de la esporulación se observó entre el séptimo y el décimo día de incubación a 24°C en condiciones de oscuridad. Las hifas presentaron paredes hialinas y lisas. Los conidióforos fueron ramificados e irregulares, con fiálides que se caracterizan por constar de una porción basal cilíndrica o hinchada,

adelgazándose abruptamente para formar un cuello. Los conidios se formaron en cadenas y presentaron forma ovoide.

En cuanto al crecimiento radial de las colonias, este fue relativamente rápido a 24°C y 30°C. Los diámetros promedio de las distintas cepas de *P. lilacinum* a los 14 días de incubación y en oscuridad para las distintas temperaturas evaluadas se muestran en las Tablas II-7, II-8 y II-9. A 10°C, el mayor diámetro lo exhibió la cepa LPSc 1368 alcanzando 17,5±3,7 mm y el menor la cepa LPSc 1370 (12,7±3,1 mm). A 24°C y 30°C la cepa LPSc 1371 presentó los mayores diámetros (66,6±2,3 y 65,3±2 mm respectivamente). Las cepas que menores diámetros mostraron a 24°C y 30°C fueron las LPSc 1367 (22,2±3,1mm) y LPSc 1373 (26,8±1,8 mm).

Se registraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento de las distintas cepas a 10°C (F: 4,26; g.l:7; p=0,002), a 24°C (F: 50,21; g.l: 7 p<0,0001) y a 30°C (F: 137; g.l: 7; p<0,0001). A 10°C, la cepa LPSc 1368 exhibió la mayor tasa de crecimiento (0,89±0,27). La mayor tasa de crecimiento a 24°C y 30°C fue la que presentó la cepa LPSc 1371 (4,4±0,17 y 4,31±0,14 mm/día). Las cepas LPSc 1367 y LPSc 1373 presentaron las menores tasas de crecimiento a 24°C y 30°C con valores de 1,23±0,22 y 1,56±0,13 mm/día respectivamente (Figuras II-16, II-17 y II-18).

Tabla II-7: Diámetro de las colonias y Tasas de crecimiento de los aislamientos de *Purpureocillium lilacinum* 10°C (media±EEM). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas según Tukey (p<0,05).

LPSc	Diámetro de la colonia (mm)	Tasa de crecimiento (mm/d)
1367	14,6±0,5	0,68±0,04 ab
1368	17,5±3,7	0,89±0,27 b
1369	15,6±0,9	0,76±0,07 ab
1370	12,7±0,4	0,55±0,03 a
1371	16,1±0,7	0,79±0,06 b
1372	15,6±1,1	0,76±0,08 ab
1373	14,5±0,5	0,68±0,04 ab
1374	16±1	0,79±0,08 b

Tabla II-8: Diámetro de las colonias y Tasas de crecimiento de los aislamientos de *Purpureocillium lilacinum* a 24°C (media±EEM). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas según Tukey ($p<0,05$).

LPSc	Diámetro de la colonia (mm)	Tasa de crecimiento (mm/d)
1367	22,2±3,1	1,23±0,22 a
1368	32,7±10	1,98±0,76 bc
1369	38±1,2	2,36±0,09 c
1370	35,6±2,7	2,18±0,19 bc
1371	66,6±2,3	4,4±0,17 e
1372	29,2±2,4	1,73±0,17 abc
1373	28,6±1,1	1,68±0,08 ab
1374	51,8±4,8	3,34±0,34 d

Tabla II-9: Diámetro de las colonias y Tasas de crecimiento de los aislamientos de *Purpureocillium lilacinum* a 30°C (media±EEM). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas según Tukey ($p<0,05$).

LPSc	Diámetro de la colonia (mm)	Tasa de crecimiento (mm/d)
1367	34,4±1,5	2,1±0,11 a
1368	33,6±5,3	2,04±0,38 a
1369	41,7±1,5	2,62±0,11 c
1370	32,2±1,3	1,94±0,09 b
1371	65,3±2	4,31±0,14 d
1372	30,8±1,1	1,85±0,08 ab
1373	26,8±1,8	1,56±0,13 a
1374	34,5±0,5	2,11±0,04 b

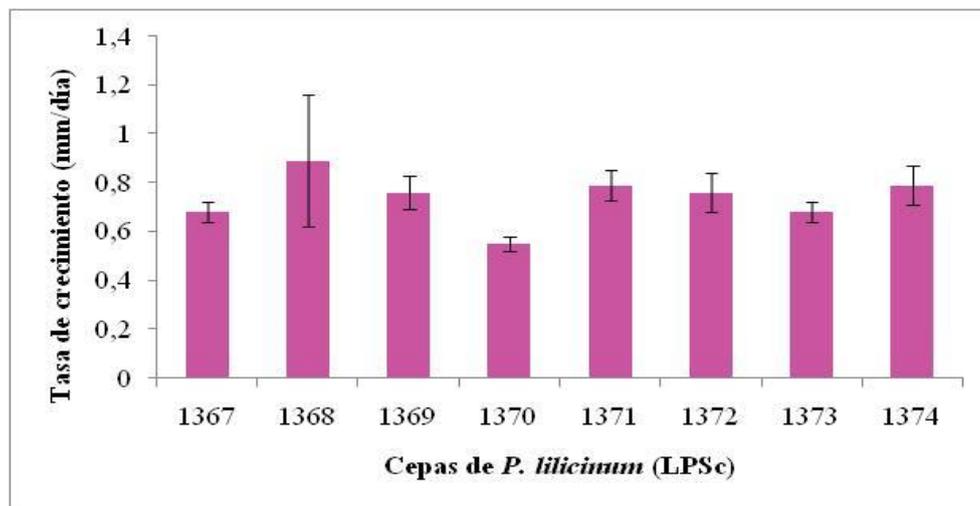


Figura II-16: Tasa de crecimiento de las diferentes cepas de *Purpureocillium lilacinum* a 10°C.

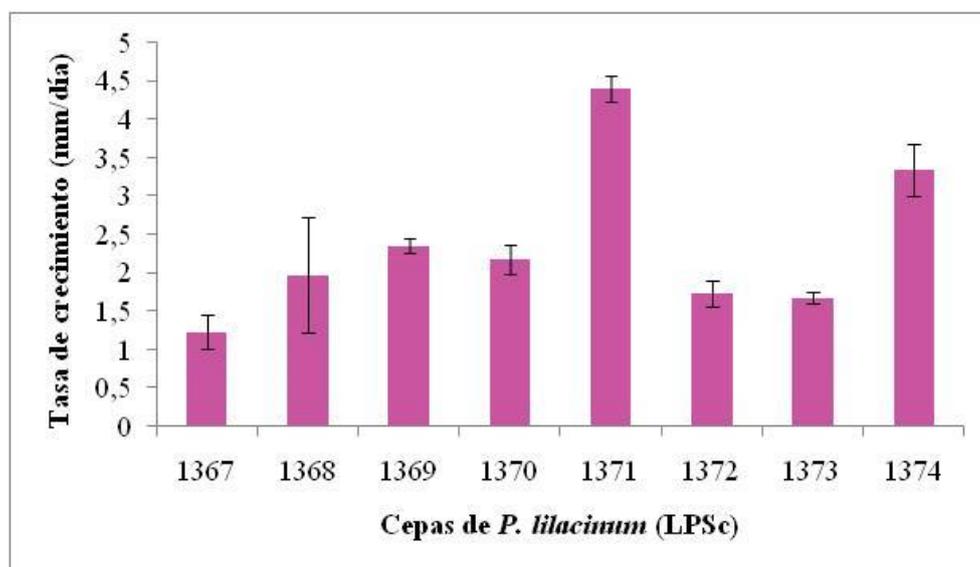


Figura II-17: Tasa de crecimiento de las diferentes cepas de *Purpureocillium lilacinum* a 24°C.

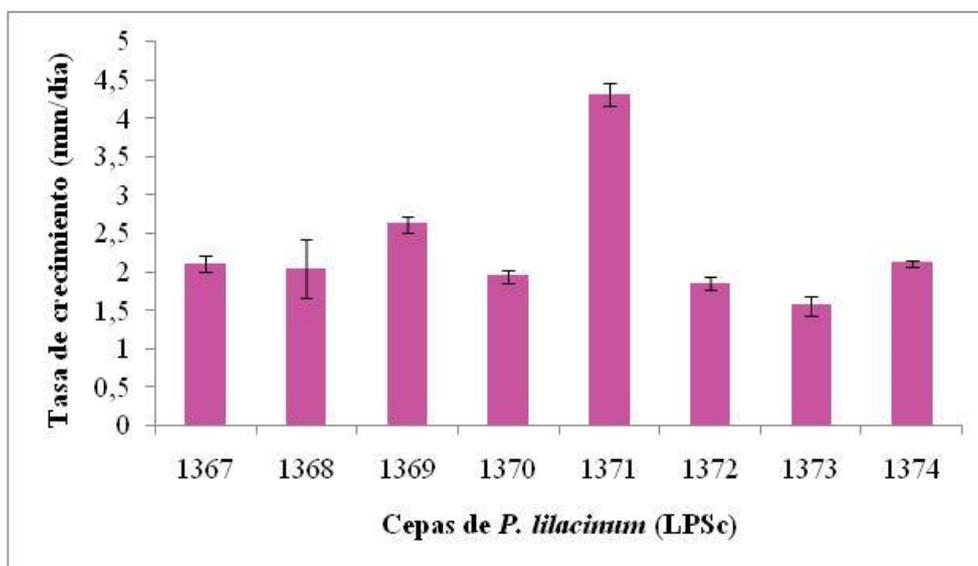


Figura II-18: Tasa de crecimiento de las diferentes cepas de *Purpureocillium lilacinum* a 30°C.

La producción de conidios en cada una de las temperaturas evaluadas, fue significativamente diferente para las distintas cepas de *P. lilacinum*, a 10°C $F=30,36$; $g.l.=7$; $p<0,0001$, a 24°C $F=347,23$; $g.l.=7$; $p<0,0001$ y a 30°C $F=251,14$; $g.l.=7$; $p<0,0001$ (Figuras II-19, II-20 y II-21 respectivamente). Siendo la cepa LPSc 1374 la que mayor cantidad de conidios produjo a las tres temperaturas evaluadas.

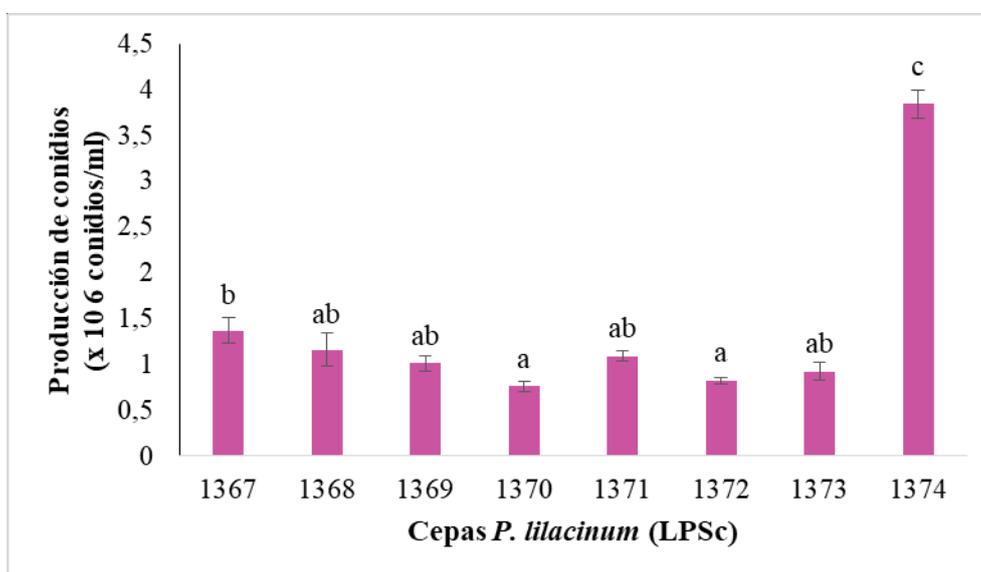


Figura II-19: Producción de conidios de las diferentes cepas de *Purpureocillium lilacinum* a 10°C. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p<0,05$).

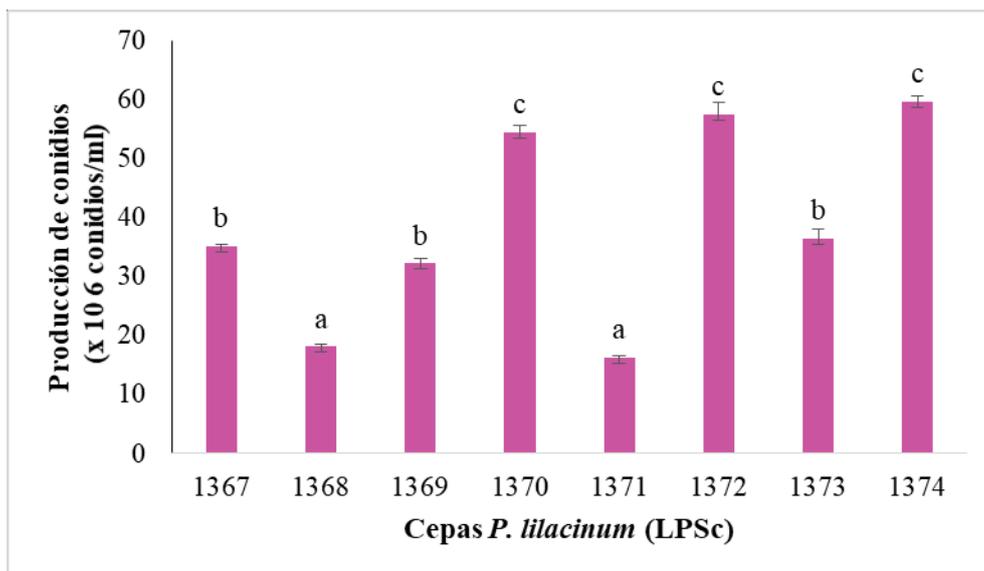


Figura II-20: Producción de conidios de las diferentes cepas de *Purpureocillium lilacinum* a 24°C. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$).

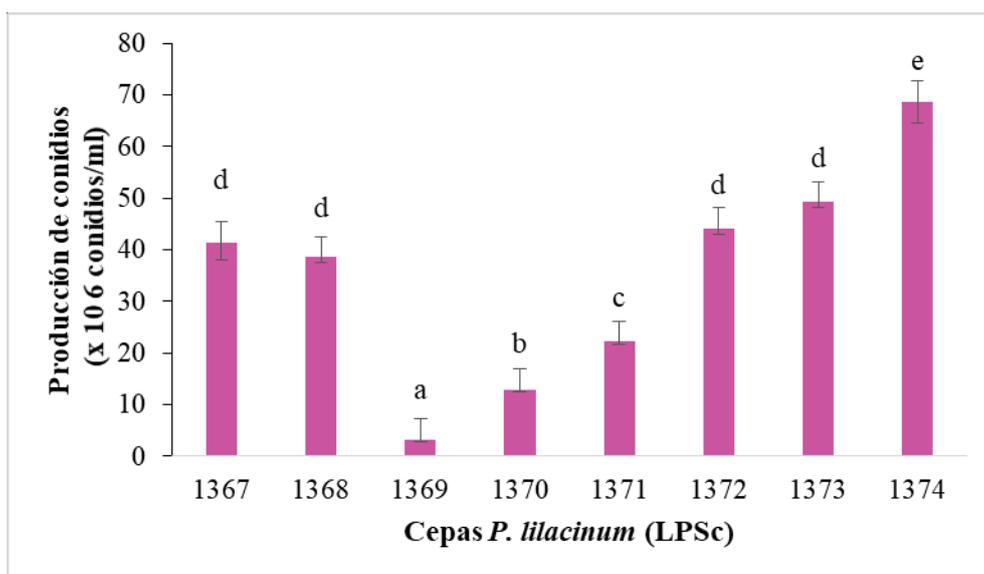


Figura II-21: Tasa de crecimiento de las diferentes cepas de *Purpureocillium lilacinum* a 30°C. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$).

La viabilidad de los conidios expresada como porcentaje de germinación no mostró diferencias significativas en ninguna de las tres temperaturas evaluadas (a 10° F=2,1; g.l.=7; $p=0,07$, a 24°C F=1,52; g.l.=7; $p=0,19$ y a 30°C F=1,03; g.l.=7, $p=0,42$). Los porcentajes de germinación se muestran en la Tabla II-10.

Tabla II-10: Porcentaje de germinación de conidios de las distintas cepas de *Purpureocilium lilacinum* (LPSc) a 10, 24 y 30°C (media±DE). Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,005$).

LPSc	% de Germinación		
	10°C	24°C	30°C
1367	98,6±1,14 a	97,2±1,79 a	98±1,22 a
1368	97,2±1,79 a	98,6±1,67 a	98±2,35 a
1369	96,2±2,39 a	97,4±2,07 a	97,4±2,35 a
1370	98±1,58 a	97,4±2,7 a	98,6±1,14 a
1371	98,8±1,3 a	99,8±0,45 a	98,8±0,84 a
1372	96±2,24 a	98,6±1,14 a	96,2±2,28 a
1373	95,8±2,28 a	96,8±1,92 a	97,2±2,49 a
1374	97,8±1,48 a	98,2±1,64 a	98,6±1,52 a

Metarhizium anisopliae (Metschn.) Sorokin (Figura II-9 C)

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

El micelio fúngico presentó un aspecto fino de color blanco en un comienzo, que se tornó verde oliva al madurar las colonias, y el reverso del micelio mostró una coloración amarillenta. El inicio de la esporulación se observó en el séptimo día de incubación a 24°C en condiciones de oscuridad. En observación microscópica se observaron hifas lisas y los conidios presentaron una forma cilíndrica con ambos extremos redondeados.

La colonia obtenida presentó un crecimiento moderadamente rápido en APG, alcanzando a los 14 días de incubación un diámetro promedio de 8±0 mm a 10°C, un diámetro de 40,7±1,5 mm a 24°C y un diámetro de 42,6±3,5 mm a 30°C. Las tasas de crecimiento respectivas a cada una de las temperaturas estudiadas fueron de 0,21±0; 0,23±0,01 y 0,27±0,02 mm/día (Figura II-22, II-23 y II-24).

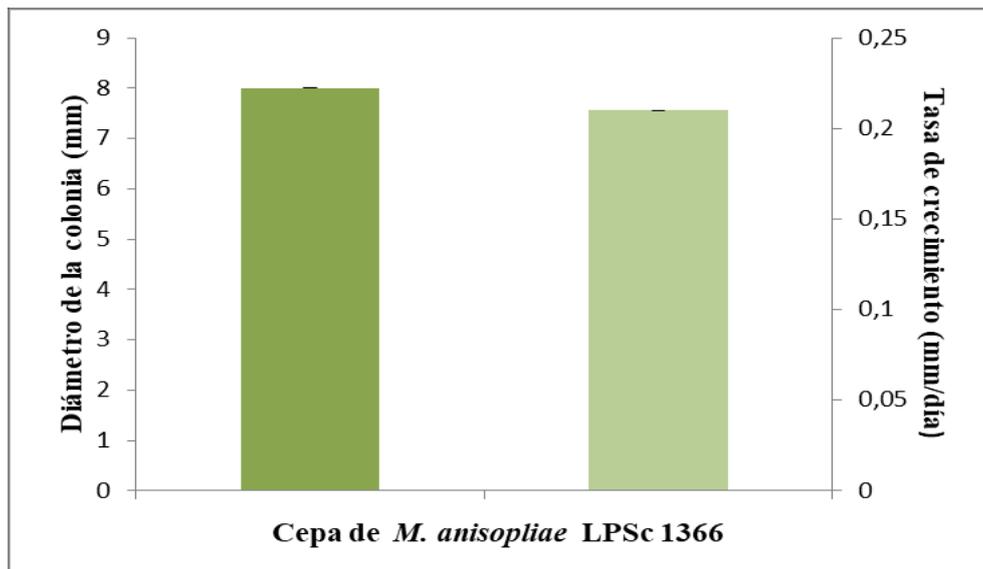


Figura II-22: Diámetro promedio (mm) y Tasa promedio (mm/día) de crecimiento de *Metarhizium anisopliae* a 10°C

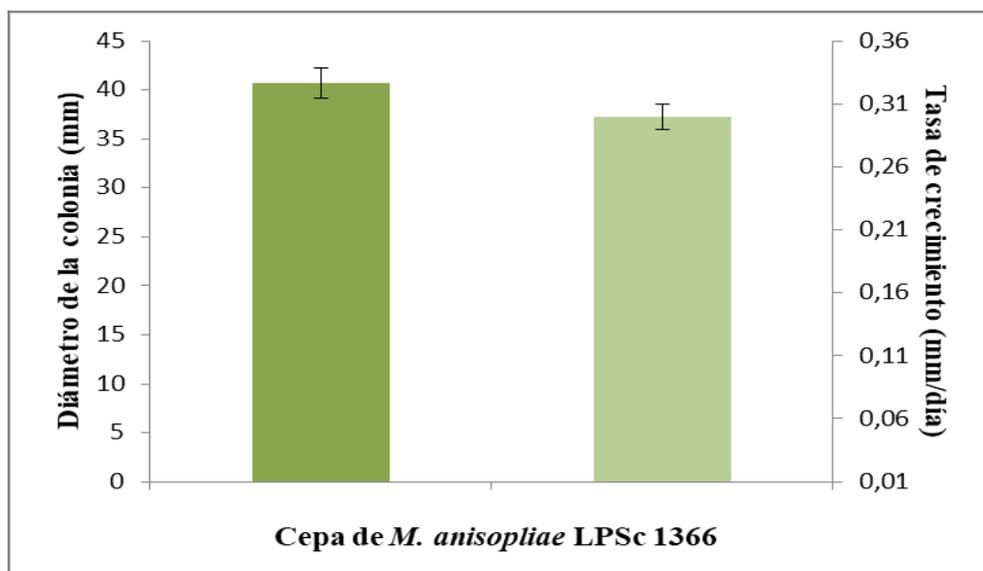


Figura II-23: Diámetro promedio (mm) y Tasa promedio (mm/día) de crecimiento de *Metarhizium anisopliae* a 24°C

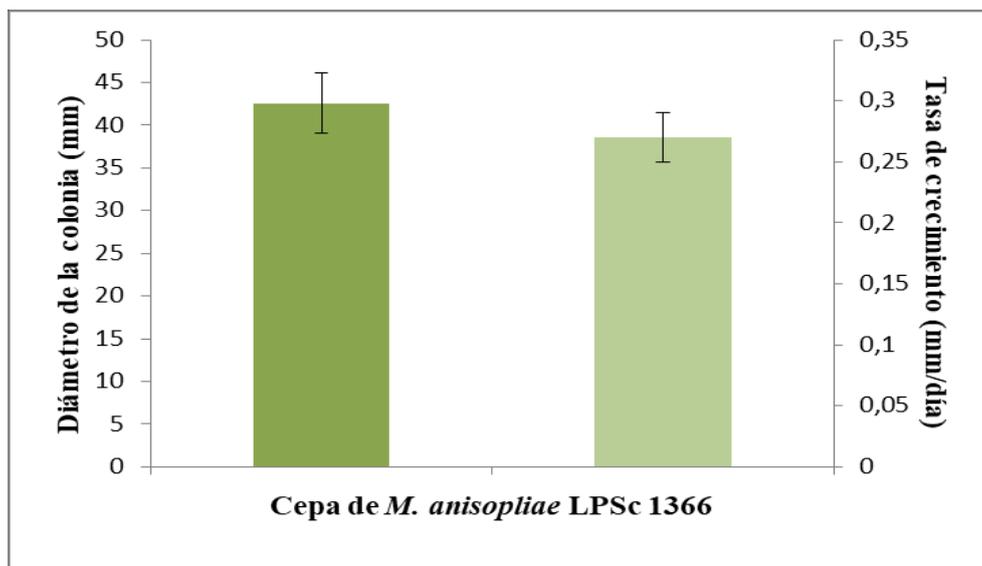


Figura II-24: Diámetro promedio (mm) y tasa promedio (mm/día) de crecimiento de *Metarhizium anisopliae* a 30°C

La producción de conidios a 10, 24 y 30°C de la cepa LPSc 1366 se muestran en la Tabla II-11.

Tabla II-11: Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* a 10, 24 y 30°C (media±DE).

Producción de conidios			
LPSc	10°C	24°C	30°C
1366	$2,8 \times 10^5 \pm 8 \times 10^4$	$5,18 \times 10^7 \pm 1,47 \times 10^6$	$1,69 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^6$

La viabilidad de los conidios de la cepa LPSc 1366 evaluada como el porcentaje de germinación a 10, 24 y 30°C fue de 98%±1,51, 99,2%±0,83 y 96,6±2,07 respectivamente (Tabla II-12).

Tabla II-12: Porcentajes de germinación de los conidios de *Metarhizium anisopliae* a 10, 24 y 30°C (media±DE).

% de Germinación			
LPSc	10°C	24°C	30°C
1366	98,4±1,51	99,2±0,83	96,6±2,07

Caracterización molecular

Análisis de diversidad

Los tres primers utilizados CA5, BA3 y 826 amplificaron un total de 55 fragmentos y generaron un patrón de entre 13 y 24 bandas (CA5= 24; BA3=13; 826=18), con un tamaño que varió entre 300 y 1200 pb. Mediante este análisis pudieron generarse 4 clusters para los 11 aislamientos de *B. bassiana* y 4 clusters para los 8 aislamientos de *P. lilacinum* (Figura II-25).

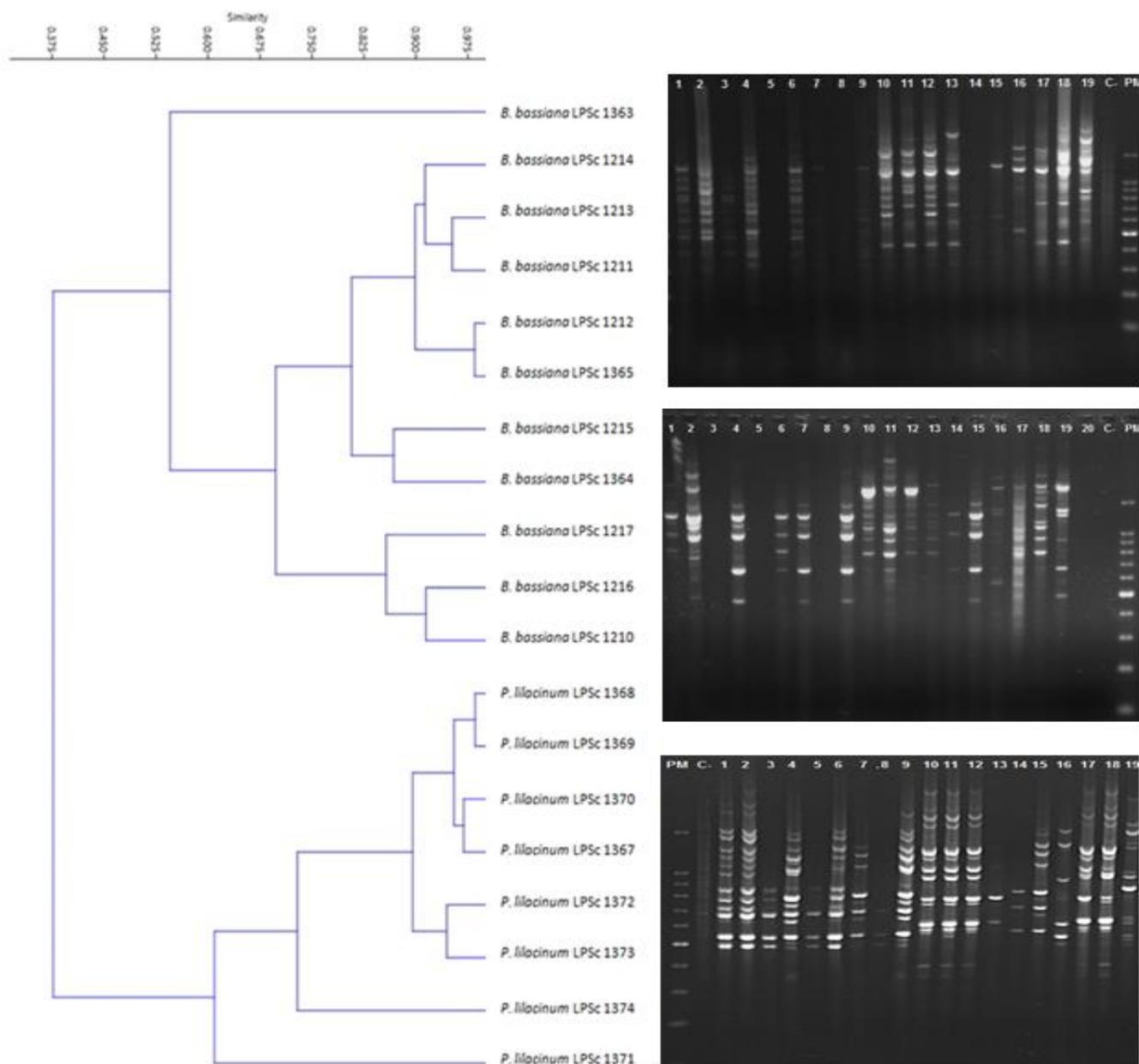


Figura II-25: Análisis de diversidad de los entomopatógenos aislados mediante marcadores ISRR.

Identificación molecular

Los amplicones del EF1 α de los 4 aislamientos seleccionados como representativos de los clusters obtenidos en el análisis de diversidad tuvieron un tamaño entre 954 a 956 pb para *B. bassiana* y entre 917 a 920 pb para *P. lilacinum*. Por otro lado, los amplicones ITS de los 4 aislamientos seleccionados como representativos de los clusters obtenidos en el análisis de diversidad tuvieron un tamaño entre 522 a 576 pb para *B. bassiana* y entre 474 a 486 pb para *P. lilacinum*. Las secuencias fueron depositadas en la base de datos del GenBank (Tabla II-13):

Tabla II-13: Número de acceso al GenBank de los aislamientos seleccionados

Especie fúngica	Cepa	Números de acceso al GenBank	
		ITS	TEF
<i>Beauveria bassiana</i>	LPSc 1213	MH050801	MK047585
<i>B. bassiana</i>	LPSc 1216	MH050800	MK015641
<i>B. bassiana</i>	LPSc 1363	MK100320	MK047587
<i>B. bassiana</i>	LPSc 1364	MH050805	MK047588
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	LPSc 1370	MH050807	MK047586
<i>P. lilacinum</i>	LPSc 1371	-	MK047589
<i>P. lilacinum</i>	LPSc 1373	MH050809	MK047590
<i>P. lilacinum</i>	LPSc 1374	MK110011	MK047591

El análisis filogenético realizado con las secuencias EF1 α permite confirmar que los aislamientos de *B. bassiana* se agrupan junto al aislamiento de referencia identificado como *B. bassiana* ARSEF 1564 gb (número de acceso GenBank HQ880974.1). A su vez, las cepas de *P. lilacinum* estudiadas se agrupan junto al aislamiento de referencia identificado como *P. lilacinum* CBS 284.36 gb (número de acceso GenBank EF468792.1) (Figura II-26). El árbol generado con las secuencias ITS también permite confirmar que los aislamientos de *B. bassiana* corresponden a la especie al estar agrupados con el aislamiento ARSEF 1564 gb (número de acceso GenBank NR111594.1), lo mismo ocurre con los aislamientos de *P. lilacinum* que se agrupan con la cepa CBS 284.36 gb (número de acceso GenBank NR111432.1) (Figura II-27). Respecto del aislamiento LPSc 1371 de *P. lilacinum* la secuencia ITS obtenida no fue lo suficientemente extensa para inscribirla en GenBank.

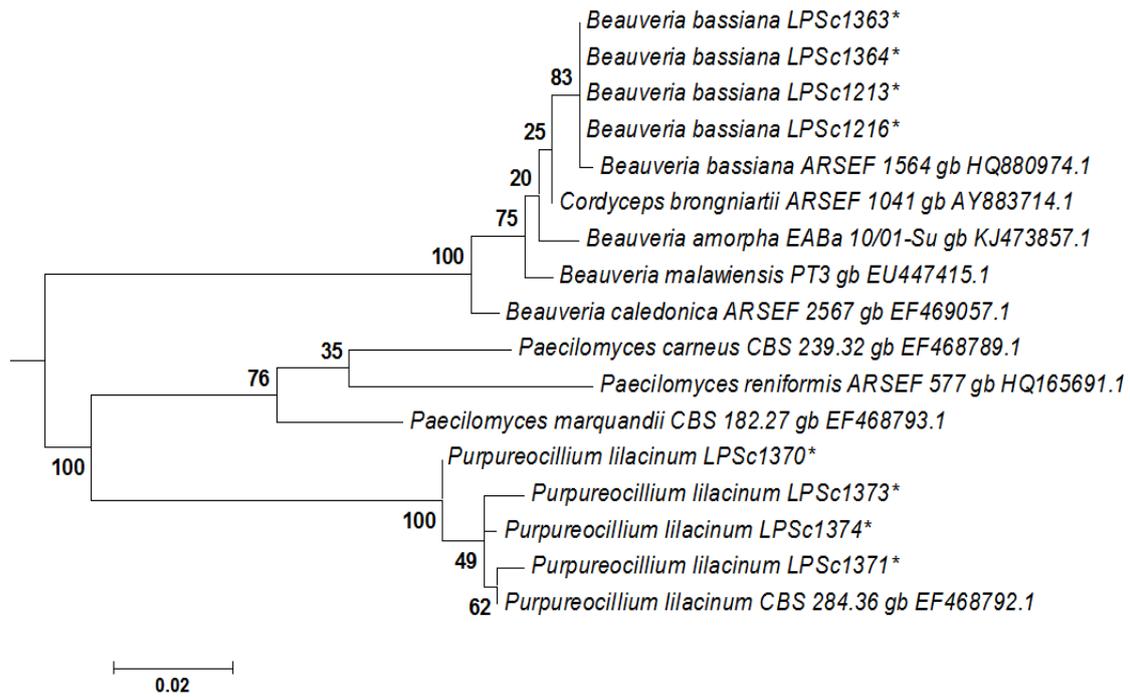


Figura II-26: Árbol filogenético construido con secuencias EF1 α .

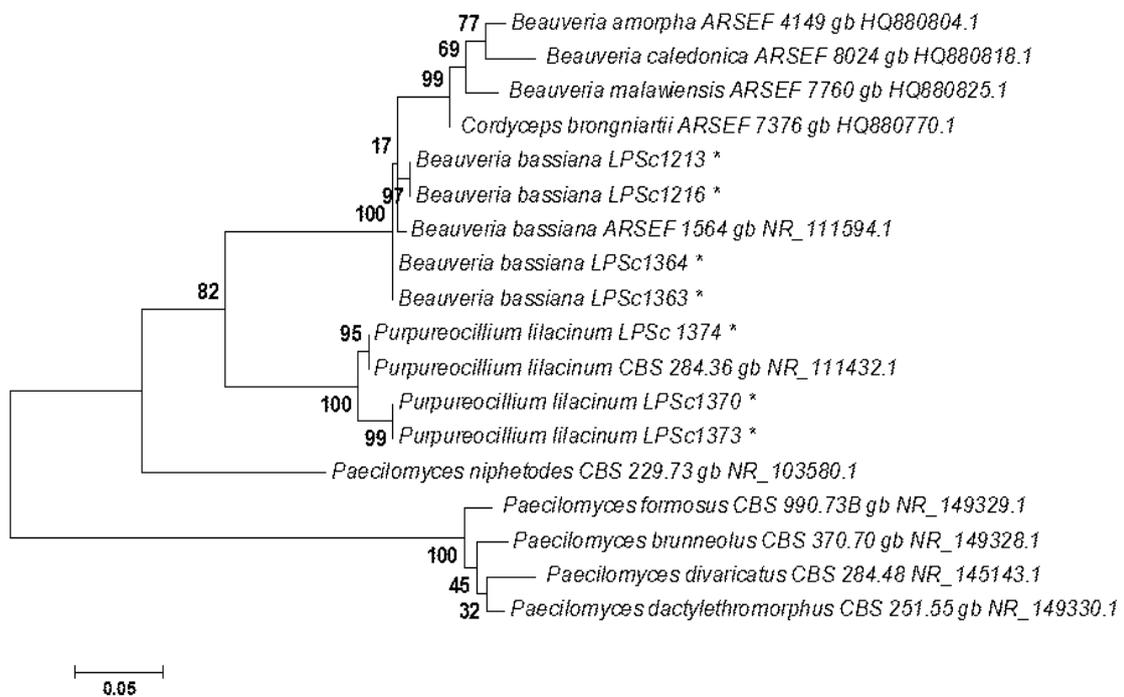


Figura II-27: Árbol filogenético construido con secuencias ITS.

Ensayo de patogenicidad

Patogenicidad contra larvas de *H. gelotopoeon*.

Existieron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad de todas las cepas estudiadas ($F= 44,45$; $g.l= 10$; $p< 0,0001$) (Figura II-28). Las cepas LPSc 1215 y LPSc 1364 de *B. bassiana* fueron las que mayor mortalidad causaron a las larvas de *H. gelotopoeon* ($100\% \pm 0$ y $97\% \pm 3$ respectivamente). Por otro lado, las cepas LPSc 1368, LPSc 1369, LPSc 1370, LPSc 1367, LPSc 1372, LPSc 1366, LPSc 1373, LPSc 1374 y LPSc 1216 no causaron mortalidad alguna sobre los insectos.

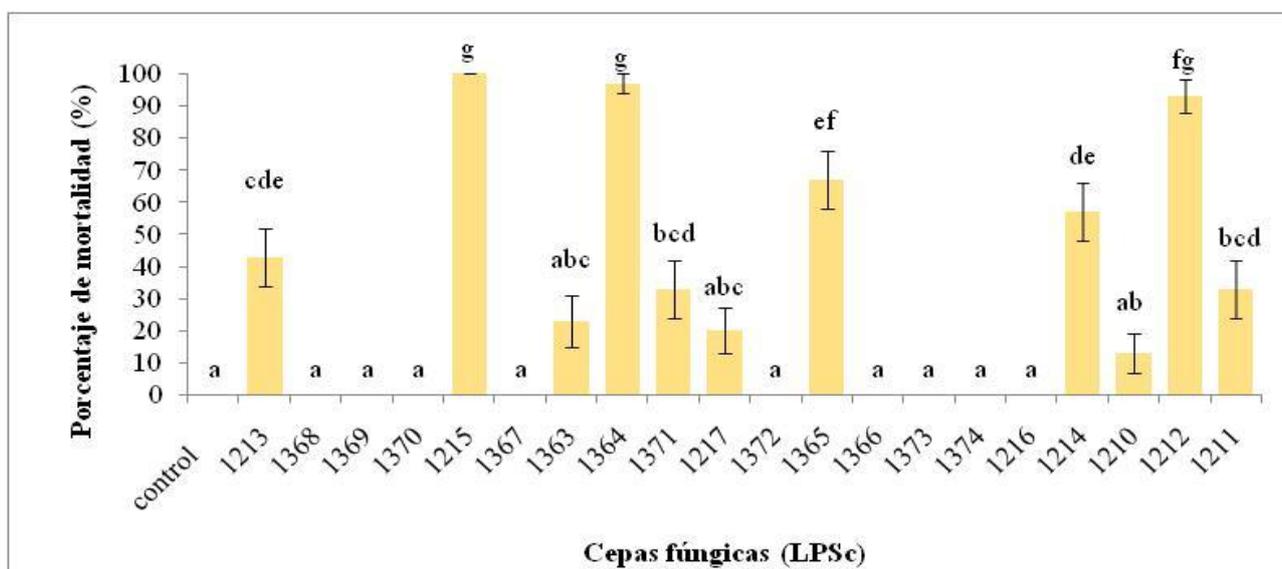


Figura II-28: Porcentajes de mortalidad (media \pm EEM) de larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* por las diferentes cepas de hongos entomopatógenos. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p<0,005$).

Para llevar a cabo el análisis de supervivencia (Kaplan-Meyer) de *H. gelotopoeon*, se seleccionaron las cepas: LPSc 1212, LPSc 1214, LPSc 1215, LPSc 1364 y LPSc 1365 ya que fueron las que presentaron valores de mortalidad mayores al 50%. El tiempo medio de supervivencia calculado para cada una de las cepas se muestra en la Tabla II-14. La cepa más virulenta fue la LPSc 1215 (TMS=4,77 días). Las cepas en las que se obtuvo un mayor tiempo

medio de supervivencia fueron la LPSc 1365 y LPSc 1214 con valores de TMS de 8,62 y 8 días respectivamente.

Tabla II-14: Tiempo medio de supervivencia (TMS) (días) (media \pm DE) para las cepas estudiadas frente a *Helicoverpa gelotopoeon*.

Cepas LPSc	TMS (días)
1212	6,7 \pm 0,52
1214	8 \pm 0,58
1215	4,77 \pm 0,19
1364	7,17 \pm 0,31
1365	8,62 \pm 0,48

Patogenicidad contra adultos de *D. speciosa*.

Existieron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad de todas las cepas estudiadas ($F= 35,92$; $g.l= 10$.; $p< 0,0001$) (Figura II-29). Las cepas LPSc 1215 y LPSc 1364 de *B. bassiana* y la cepa LPSc 1368 de *P. lilacinum* fueron las que mayor mortalidad causaron a los adultos de *D. speciosa* (100% \pm 0; 90% \pm 6 y 80 \pm 7 respectivamente). Por otro lado, las cepas LPSc 1371, LPSc 1366, LPSc 1217, LPSc 1363, LPSc 1373 y LPSc 1216 no causaron mortalidad alguna sobre los insectos.

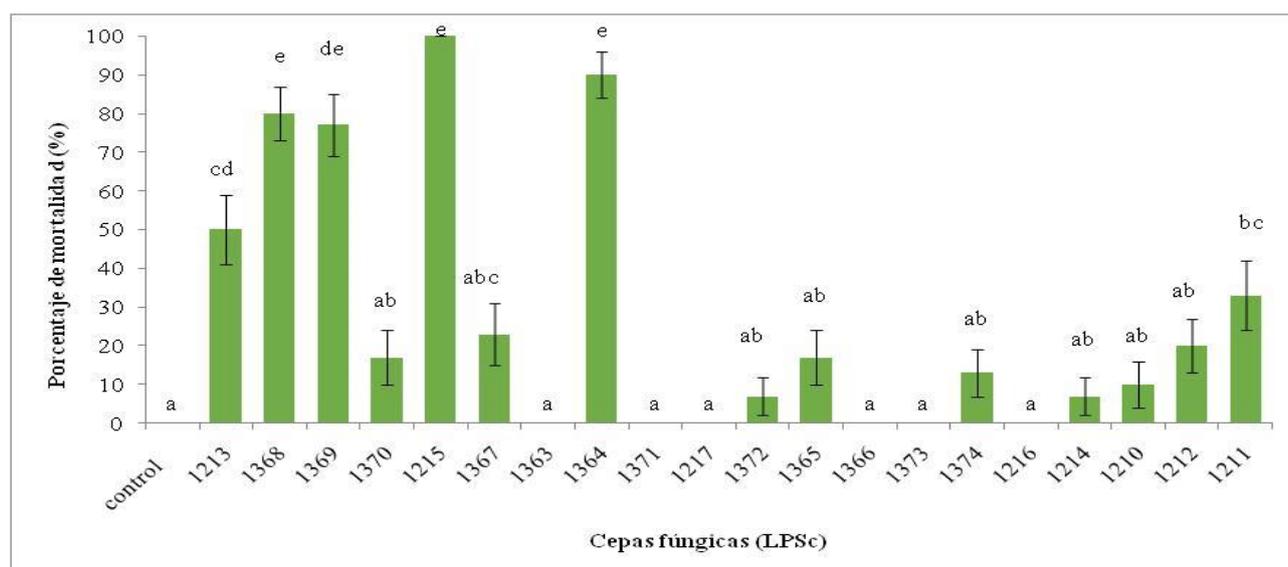


Figura II-29: Porcentajes de mortalidad (media±EEM) de adultos de *Diabrotica speciosa* por las diferentes cepas de hongos entomopatógenos. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,005$).

El análisis de supervivencia (Kaplan-Meyer) llevado a cabo con adultos de *D. speciosa*, se realizó con las cepas LPSc 1213, LPSc 1215, LPSc 1364, LPSc 1368 y LPSc 1369, por ser estas las que mataron a más de la mitad de los individuos empleados en el bioensayo. Los tiempos medios de supervivencia para estas cepas se presentan en la Tabla II-15. En este caso la cepa LPSc 1369 fue la que mostró el menor valor de TMS constituyendo la cepa más virulenta de las estudiadas (log-rank test $p < 0,0001$). En contraste, las cepas LPSc 1364 y LPSc 1213 fueron las menos virulentas con valores de TMS de 8,87 y 8,034 días.

Tabla II-15: Tiempo medio de supervivencia (TMS) (días) (media ± DE) para las cepas estudiadas frente a *Diabrotica speciosa*.

Cepas LPSc	TMS días
1213	8,034±0,5
1215	7,73±0,28
1364	8,87±0,39
1368	6,57±0,31
1369	6,1±0,2

Discusión

En este estudio, no fueron registrados insectos infectados naturalmente con hongos entomopatógenos en los cultivos de tabaco de Jujuy. Estos resultados podrían ser consecuencia de la gran cantidad de insecticidas empleados en el cultivo de tabaco, y por lo tanto, la baja densidad de insectos plaga registrados en esa etapa del cultivo.

A partir de las muestras de suelo analizadas se obtuvieron 20 cepas de hongos entomopatógenos, correspondientes a tres especies: 1 cepa de *M. anisopliae*, 8 de *P. lilacinum* y 11 de *B. bassiana*. Estas especies se encuentran típicamente en regiones templado-cálidas y han sido registradas tanto en suelos naturales como agrícolas (Vega 2008). La presencia de estas especies en la provincia de Jujuy representa un nuevo registro de hongos entomopatógenos para la región asociados al cultivo del tabaco.

Meyling & Eilenberg (2006) y Vega et al. (2009) reportaron mayor abundancia de *M. anisopliae* en suelos perturbados a diferencia de lo registrado en este estudio donde sólo pudo aislarse una cepa de esta especie. Una posible explicación para este resultado podría ser que el medio de cultivo selectivo (Oatmeal agar + CTAB + cloranfenicol) utilizado no favoreció el crecimiento de este entomopatógeno. En este sentido Posadas et al. (2012) observaron menores tasas de crecimiento de *M. anisopliae* en este medio. Además, Klingen et al. (2002) plantean que para poder obtener un espectro más representativo de los hongos entomopatógenos presentes en suelos sería necesario utilizar un variedad de métodos de aislamiento, desde la utilización de medios selectivos hasta utilizar distintas especies de insectos trampa o cebos que sean susceptibles a distintos patógenos. También cuestiones relacionadas al tipo de ambiente (clima, altitud), tipo y bioquímica del suelo han sido factores que se menciona afectan la presencia de las especies de *Metarhizium* spp. en los suelos, así como la diversidad de insectos edáficos (Rodríguez et al. 2005, Cannon 1996). Estas circunstancias no fueron registradas en este estudio, pero en futuras investigaciones deberían tenerse en cuenta para obtener un registro más completo de la diversidad de hongos entomopatógenos en suelos. Por otra parte, también puede pensarse que los suelos del cultivo de tabaco no sean suelos tan perturbados en cuanto al laboreo (ya que no se emplean grandes maquinarias agrícolas, el transplante y cosecha se realizan de forma manual) que se realiza de los mismos como un suelo agrícola de la región pampeana o de las regiones de estudio de los trabajos antes mencionados. Futuros estudios deberían utilizar distintas técnicas de aislamiento y además presentar una caracterización físico-química de las propiedades del suelo utilizado ya que estos factores también afectan la distribución y abundancia de los microorganismos del suelo.

Otro factor que podría influir en la frecuencia y diversidad de los aislamientos sería la cantidad de insumos químicos que se emplean en el cultivo. Cuando se analiza la diversidad de hongos entomopatógenos en suelos agrícolas no pueden dejar de considerarse las consecuencias que sobre esta pueden provocar los fitosanitarios empleados (particularmente en las plantaciones de tabaco los fungicidas Carbendazim, Mancozeb, Metalaxil, y Terramicina) que podrían influir en el crecimiento de los hongos entomopatógenos presentes en el suelo, afectando en consecuencia la capacidad para ser registrados en los mismos. Existen estudios realizados en países como Polonia (Tkaczuk et al. 2014), Noruega (Klingen et al. 2002) y Alemania (Kleespies et al. 1989) en los que se han reportado mayores frecuencias de hongos entomopatógenos en suelos de manejo orgánico que en aquellos con manejo convencional, sugiriendo que el alto contenido de materia orgánica en los primeros, estimula la prevalencia de los hongos Hypocreales en el suelo. Por otro lado, Jabbour & Barbercheck (2009) no encontraron diferencias en la prevalencia de entomopatógenos entre cultivos de centeno con distinto tipo de manejo, el mismo hecho ha sido reportado por Goble et al. (2010) en citrus y por Meyling et al. (2011) en cultivos de zanahoria y repollo.

Además, la ocurrencia natural y diversidad de los Hypocreales entomopatógenos en suelo sería afectada no sólo por el tipo de producción, si no que por la interacción de diversos factores bióticos y abióticos, como las condiciones climáticas, el tipo de ambiente, las propiedades del suelo, las prácticas agronómicas, las especies vegetales y animales presentes en el ambiente y los métodos de muestreo. (Ramos et al. 2017).

El crecimiento de las colonias de las distintas cepas de *B. bassiana* alcanzó los mayores valores a 24°C y 30°C. Estos resultados son acordes a los obtenidos por Clifton et al. (2015) quienes proponen que el rango óptimo de temperaturas para el crecimiento de las especies de *Beauveria* es de 24 a 30°C. En concordancia, Mwamburi et al. (2015), Ekesi et al. (1999) y Yeo et al. (2003) también establecen que para el crecimiento, mayor producción y germinación de conidios de los hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio la temperatura óptima es de 24°C.

En cuanto al estudio de diversidad mediante el análisis de ISSR, los 11 aislamientos de *B. bassiana* se agruparon en 4 clusters. Las cepas LPSc 1215 y LPSc 1364 que fueron las que mayores niveles de patogenicidad frente a las plagas estudiadas se agruparon y lo mismo ocurrió con las cepas LPSc 1368 y LPSc 1369 de *P. lilacinum* más virulentas. La identificación basada en caracteres morfológicos ha sido tradicionalmente empleada para determinar especies de hongos, sin embargo Rehner & Buckley (2005) han sugerido la existencia de especies crípticas que presentan rasgos fenotípicos idénticos pero cuyo genotipo difiere. Por este motivo es que en la actualidad las técnicas basadas en la biología molecular son necesarias para confirmar la identidad de las especies (Toledo et al. 2018). Los resultados de esta investigación permitieron agrupar en un mismo clado

los aislamientos del género *Beauveria* por un lado y las del género *Purpureocillium* por el otro, separados de otras especies similares morfológicamente. Así, puede establecerse que el análisis de las secuencias del EF1 α e ITS permite la identificación de especies dentro de los géneros *Beauveria* y *Purpureocillium*. Además, los patrones de bandas generados con los 3 marcadores ISSR utilizados permitieron agrupar los aislamientos en base a un carácter importante de determinar al momento de seleccionar cepas para su empleo en control de plagas, como es la patogenicidad.

CAPÍTULO 3

Capacidad endofítica de los hongos entomopatógenos



Objetivo

Evaluar la capacidad endofítica de los hongos entomopatógenos aislados en condiciones de laboratorio

Introducción

Los hongos entomopatógenos son importantes factores reguladores de las poblaciones de insectos plaga presentando potencial para su desarrollo como micopesticidas. Sin embargo, la ecología de estos hongos se extiende más allá de la interacción directa hongo-insecto y se requiere una perspectiva más amplia para entenderla plenamente. En este sentido, hace algunos años se ha reportado además su capacidad endofítica (organismos que asintóticamente colonizan el interior de los tejidos vegetales) (Wilson 1995), tanto de manera natural, como artificial por inoculación mediante distintas técnicas (Roy et al. 2010).

La utilización de hongos entomopatógenos como endófitos es una reciente herramienta que mejora la eficacia del control biológico efectuado por estos microorganismos (Vega 2018). La presencia de estos hongos como endófitos, les permite obtener una serie de ventajas, frente a otros métodos de aplicación, ya que les permite estar menos expuestos al daño provocado por la radiación UV y a condiciones microclimáticas adversas en el campo, son compatibles con otros grupos de enemigos naturales y son capaces de afectar plagas que de otro modo serían difíciles de controlar debido a sus hábitos (por ejemplo, especies que habitan el envés de las hojas) (Vidal & Jaber 2015).

Los hongos entomopatógenos pueden transcurrir períodos variables de sus ciclos de vida como endófito en muchas especies vegetales, penetrando a través de las hojas, raíces e incluso las semillas (Butt et al. 2016). Algunos entomopatógenos han sido identificados como endófitos naturales en más de una planta huésped, lo que indica que son capaces de colonizar varias especies de plantas. El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill ha sido citado como endófito natural de varias especies vegetales, como ejemplo: barrón (*Ammophila arenaria*) (Collado et al. 1999); carpe americano (*Carpinus caroliniana*) (Ganley & Newcombe 2006); café (*Coffea arabica*) (Quesada- Moraga et al. 2006); encina (*Quercus ilex*) (Miles et al. 2012); pino insigne (*Pinus radiata*) (Brownbridge et al. 2012). A su vez, *Purpureocillium* sp. se aisló de dátilo (*Dactylis glomerata*) (Sanchez Márquez et al. 2007); plátano rojo (*Musa acuminata*) y arroz (*Oryza sativa*) (Vega et al. 2008). *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn fue aislada de pata de perdíz (*Cynodon dactylon*) (Quesada Moraga et al. datos sin publicar). Además otros Hypocreales como

Tolypocladium cylindrosporum Gams, *Hirsutella aphidis* Petch e *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. han sido aislados naturalmente en varias especies vegetales (Giordano et al. 2009; Marquez et al. 2010).

A su vez, *B. bassiana*, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams, *M. anisopliae* y *Purpureocillium* spp, han sido artificialmente inoculadas y re aisladas como endófitos en una gran variedad de especies vegetales (Vega 2008), mostrando capacidad para reducir el daño provocado por distintas especies de insectos fitófagos (Vidal & Jaber 2015). *B. bassiana* es la especie de hongo entomopatógeno mayormente estudiada, que ha sido aislada más veces recurrentemente endófito en distintas especies vegetales. Artificialmente se ha introducido en diferentes especies de plantas como café, yute (*Corchorus olitorius*), banana (*Musa* sp.), adormidera (*Papaver somniferum*), palmera (*Phoenix dactylifera*), pino insigne, sorgo (*Sorghum bicolor*), cacao (*Theobroma cacao*), maíz (*Zea mays*), tomate, (*Solanum lycopersicum*) y judía (*Phaseolus vulgaris*) (Leckie 2002; Ownley et al. 2004; Parsa et al. 2013; Gurulingappa et al. 2011; Akello et al. 2007; Gómez-Vidal et al. 2006; Posada & Vega 2005; 2006; Brownbridge et al. 2012; Quesada-Moraga et al. 2006; Allegrucci et al. 2017). Por otro lado, *M. anisopliae*, fue introducido en soja (*Glycine max*) (Russo et al. 2018), tomate (*S. lycopersicum*) (García et al. 2011), pasturas (*Panicum virgatum* y *P. vulgaris*) (Sasan & Bidochka 2012) y *Purpureocillium lilacinum* en algodón (*Gossypium hirsutum*) (López Castillo et al. 2014).

El grado de colonización endofítica que desarrollan los hongos entomopatógenos en las plantas se ve influenciado por factores bióticos y abióticos. Entre los primeros, puede mencionarse la composición química de las hojas (ceras y cutinas) que afecta la colonización ya que puede dificultar la penetración de los conidios dependiendo de la cantidad de alcoholes, ácidos grasos y alcanos presentes (Posada et al. 2007), a su vez la edad de las hojas también puede influir en la capacidad de los hongos para penetrarlas, ya que aquellas más jóvenes presentan mayores concentraciones de compuestos antifúngicos (fenoles y taninos) (Arnold & Herre 2003). Entre los factores abióticos, una alta exposición a la radiación UV o baja humedad del ambiente influyen en el éxito de la colonización.

A su vez, cuando son inoculados artificialmente influyen también el medio de cultivo empleado para el reislamiento, la edad y especie de la planta, la concentración del inóculo, la especie y cepa de entomopatógeno inoculada y el método de inoculación empleado (Bamisile et al. 2018). En cuanto a los métodos de inoculación pueden mencionarse algunos de los más empleados en la literatura científica sobre el tema. La inyección en tallo consiste en utilizar una aguja para la inoculación directa de las suspensiones de conidios en el tallo de las plantas, ha sido testada en algunas especies de importancia, por ejemplo puede mencionarse el trabajo realizado por Posada et al. (2007) en plantas de café en el que la colonización por *B. bassiana* fue exitosa en comparación a

otro métodos. Sin embargo, Akello et al. (2007) reportan baja efectividad de este método en plantas de banana. Otro método usualmente empleado es la inoculación de semillas que consiste en colocar durante un período de tiempo las semillas en soluciones de conidios para luego sembrarlas. Mediante esta técnica, Russo et al. (2015) reportan la ausencia de colonización por *B. bassiana* en hojas y tallos. Pueden mencionarse también el método de inmersión de raíz y de inoculación de suelo. El primero consiste en sumergir en el inóculo las raíces de las plantas a estudiar por unas 24 horas, esta técnica fue exitosa para la colonización por *B. bassiana* en *P. radiata* (Brownbridge et al. 2012), de tomate (Qayyum et al. 2015) y de tabaco, maíz, trigo y soja (Russo et al. 2015). El segundo, comprende la aplicación de las suspensiones de conidios alrededor de la zona de la raíz en los plantines, fue reportada como una técnica exitosa por Tefera & Vidal (2009), Parsa et al. (2013), Greenfield et al. (2016), Jaber & Araj (2018).

Sin embargo el método más ampliamente utilizado para la inoculación de hongos entomopatógenos es la aspersión foliar que consiste en el empleo de aspersores para la aplicación de las soluciones en hoja, asemejándose a la aplicación de insecticidas convencionales. Existen reportes de colonización exitosa mediante esta técnica en plantas de coliflor (Kaur et al. 2015), alfalfa (Resquín-Romero et al. 2016), trigo (Russo et al. 2015; Sánchez-Rodríguez et al. 2018), sorgo (Tefera & Vidal 2009), soja (Russo et al. 2015) y tomate (Qayyum et al. 2015; Resquín-Romero et al. 2016). Russo et al. (2015) estudiaron el éxito de distintos métodos de inoculación de *B. bassiana* en tabaco mediante las técnicas de inmersión de raíz, inoculación de semillas y aspersión foliar. Esta última fue la más efectiva para la colonización del hongo en tabaco.

En cuanto a la localización de los endófitos fúngicos dentro de los tejidos vegetales, estudios recientes utilizando técnicas moleculares, microscopía confocal y cepas modificadas de *B. bassiana*, demostraron que mediante la técnica de aspersión foliar, el hongo colonizó los tejidos aéreos de *P. somniferum* principalmente, el espacio intercelular (apoplasto), además se registró un descenso del porcentaje de colonización a medida que transcurrió el tiempo post-inoculación (Landa et al. 2013). En este caso las hifas fúngicas sólo fueron observadas en el espacio intercelular de hojas y tallos, y en determinadas regiones del parénquima cercano al haz vascular principal, pero nunca dentro de tejidos vasculares (Landa et al. 2013). Por el contrario, Quesada-Moraga et al. (2006) utilizando microscopía electrónica de barrido encontraron que, las estructuras fúngicas lograron alcanzar el xilema. Las especies del género *Metarhizium* han sido aisladas casi con exclusividad en las raíces de las plantas, mientras que *B. bassiana* ha sido aislada de diferentes órganos vegetales (Behie et al. 2015).

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente expuestos, el objetivo de este ensayo fue probar la capacidad endofítica de distintas especies de hongos entomopatógenos en plantas de tabaco en condiciones de laboratorio.

Materiales y Métodos

Selección de cepas y preparación de inóculos

Para este ensayo se utilizaron aislamientos fúngicos provenientes de la Colección Micológica de hongos filamentosos del Instituto Carlos Spegazzini (LPSc), La Plata, Buenos Aires, Argentina. Los aislamientos fúngicos utilizados fueron los siguientes:

Beauveria bassiana: LPSc 1082, LPSc 1098, LPSc 1365, LPSc 1212, LPSc 1217, LPSc 1214, LPSc 1216, LPSc 1213, LPSc 1215, LPSc 1210, LPSc 1211, LPSc 1363 y LPSc 1364.

Metarhizium anisopliae: LPSc 907 y LPSc 1366.

Purpureocillium lilacinum: LPSc 1368, LPSc 1369, LPSc 1370, LPSc 1367, LPSc 1371, LPSc 1372, LPSc 1373 y LPSc 1374.

Las cepas de *B. bassiana* LPSc 1082, LPSc 1098, y *M. anisopliae* LPSc 907 fueron seleccionadas de la Colección de Hongos Filamentosos del Instituto Spegazzini, debido a su comprobada eficacia contra insectos plaga y a sus altos valores de actividad enzimática (proteolítica, quitinolítica y lipolítica) de acuerdo a los trabajos llevados a cabo por (Pelizza et al. 2012a,b). Las restantes 20 cepas corresponden a aquellas aisladas de suelos en las fincas tabacaleras en el presente trabajo de tesis doctoral.

Para obtener la suspensión de conidios a inocular de las diferentes cepas de cada especie se empleó el mismo protocolo descrito en el Capítulo 2 (Figura III-1).

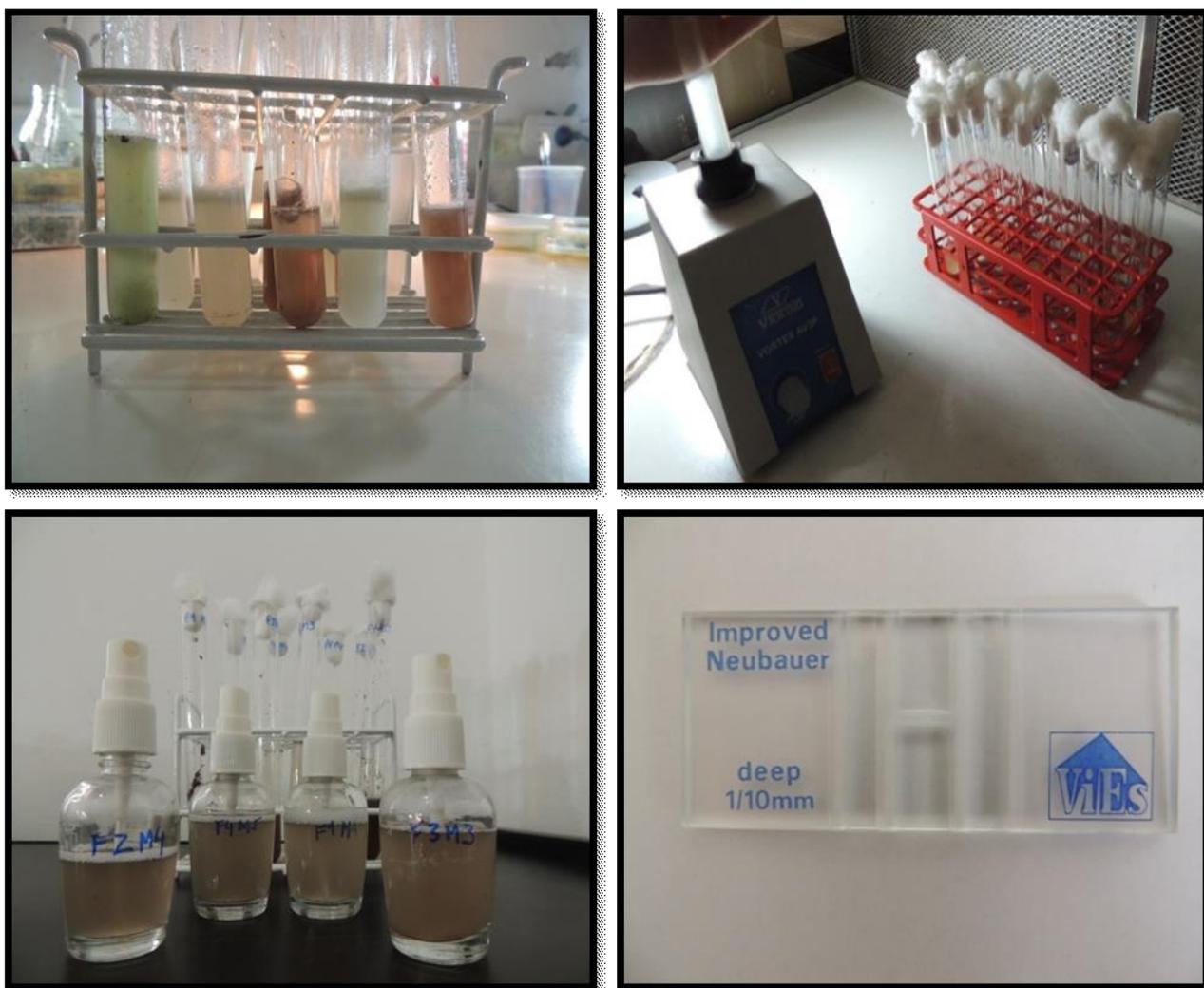


Figura III-1: Preparación de las soluciones de conidios.

Plantas

Las semillas de *N. tabacum* utilizadas en este trabajo fueron provistas por la Cooperativa de Tabacaleros de Jujuy Ltda. Argentina (Variedad Virginia K394). Previo a ser utilizadas, las semillas fueron esterilizadas superficialmente. Se las sumergió en una solución de alcohol 70 % durante 2 minutos y se las enjuagó 2 veces con agua estéril, luego se las colocó durante 24 horas en agua destilada estéril para facilitar su germinación. De este modo se elimina cualquier tipo de microorganismo que se encuentre previamente sobre la superficie de las semillas (Brownbridge et al. 2012).

El sustrato utilizado para la siembra fue una mezcla de tierra-perlita-vermiculita en partes iguales (1:1:1), que previo a su utilización fue tinalizado en autoclave durante períodos de una

hora, con intervalos de 24 hs en 3 días consecutivos, esto fue realizado, para eliminar la presencia de microorganismos no deseados.

Las semillas fueron sembradas en speedlings de 276 celdas, hasta el estadio de dos hojas verdaderas. Luego fueron trasplantadas a macetas de plástico de 330 cm³ de capacidad con el sustrato mencionado anteriormente. Las plantas se mantuvieron en invernáculo bajo condiciones controladas (25°C y 12h L:O de fotoperíodo), y fueron regadas cada vez que fue necesario (Figura III-2).

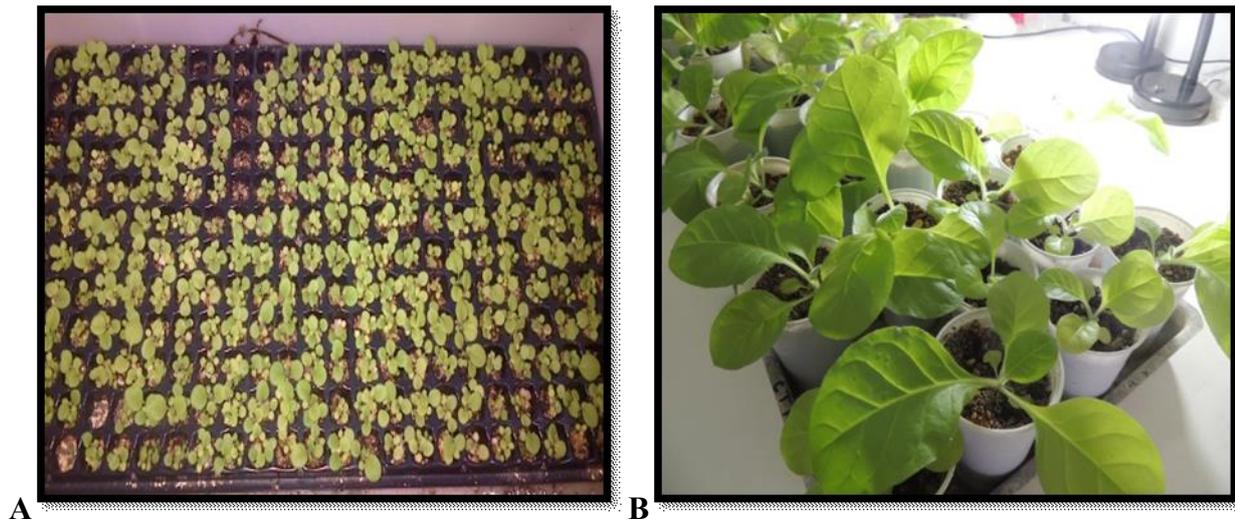


Figura III-2: Plantas de *Nicotiana tabacum* **A-** Plántulas. **B-** Plantas utilizadas en los bioensayos.

Inoculación mediante la técnica de aspersión en hojas

Para inocular los hongos entomopatógenos en las plantas de tabaco se utilizó el método de aspersión de hojas. Esta técnica fue la que mayor eficacia presentó en estudios previos, para permitir el establecimiento como endófitos de hongos entomopatógenos en plantas de tabaco (Russo et al. 2015). Las plantas fueron inoculadas (por única vez) a las 6 semanas de edad, momento en el cual presentaban 4-6 hojas verdaderas, con cada una de las cepas. Se realizaron 10 repeticiones con sus respectivos controles, evaluándose la colonización endofítica a los 7, 14, 21 y 28 días postinoculación. Este mismo procedimiento fue repetido tres veces en el tiempo con intervalos de dos meses.

Al momento de la inoculación las porciones superiores de las macetas se cubrieron con papel aluminio para evitar la inoculación del suelo con conidios (Tefera & Vidal 2009). Se utilizó un atomizador manual para pulverizar 2 ml de las suspensiones de conidios de las distintas cepas

por planta, rociando únicamente la superficie abaxial de todas las hojas. Las plantas controles fueron pulverizadas de la misma manera con una solución de agua estéril con Tween 80 (0,01%), libre de conidios.

Por último, las plantas tratadas y controles fueron colocadas en invernáculo bajo condiciones controladas de luz y temperatura (25°C y 12 h. L: O)



Figura III-3: A- Suspensiones de conidios de hongos entomopatógenos. B- Inoculación de plantas de tabaco.

Re-aislamiento del hongo

La colonización de las plantas de tabaco por las diferentes cepas de hongos se evaluó a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación.

Se utilizaron 10 plantas en cada una de las fechas evaluadas y 10 plantas testigo que fueron completamente procesadas. Cada planta se enjuagó con abundante agua corriente para retirar los restos de sustrato y posteriormente fueron separados los distintos órganos (raíz, tallo y hoja). La esterilización superficial consistió en sumergir cada una de estas partes en alcohol 70% durante 2 minutos, luego en hipoclorito de sodio (lavandina comercial 55g Cl/l) durante 2 minutos y finalmente se enjuagó 2 veces con agua destilada estéril (Posada et al. 2007). Las hojas se cortaron con bisturí estéril en cuadrados de 1 x 1cm, tallos y raíces en segmentos de 1 cm de largo. El material vegetal, se colocó en cajas de Petri (6 segmentos por caja) conteniendo APG más antibiótico (cloranfenicol y estreptomicina) (Vega et al. 2008). Para determinar la eficiencia del proceso de esterilización se colocó 1 ml del agua del último enjuague de las muestras en cajas de Petri con medio de cultivo APG.

Las cajas fueron conservadas bajo condiciones controladas (25°C y oscuridad) en cámaras de cría. Periódicamente durante un mes, fueron observadas para verificar la emergencia de las cepas de interés desde los tejidos vegetales.

Análisis de los datos

Se registró la emergencia de los entomopatógenos inoculados a los 7, 14, 21 y 28 días post-inoculación. Para cada cepa y cada órgano se calculó el porcentaje de colonización mediante la fórmula de Petrini y Fisher (Petrini & Fisher 1987).

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de segmentos vegetales con crecimiento fúngico}}{\text{total de segmentos incubados}} \times 100$$

Se determinó la existencia de diferencias significativas en los porcentajes de colonización entre las cepas estudiadas y el tiempo post-inoculación en cada órgano (raíz, tallo y hoja) realizando un Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos vías. Para la posterior separación de tratamientos se realizó un test *a posteriori* (Test de Tukey, $p < 0.05$).

Los datos de colonización al estar expresados en porcentajes, debieron ser transformados a la función arcoseno. Previo a la aplicación del test paramétrico se corroboró el cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianzas y de la normalidad de los errores.

Los datos fueron analizados utilizando el programa InfoStat versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011).

Resultados

Las plantas control en ningún caso mostraron colonización endofítica por parte de las especies de hongos entomopatógenos estudiadas.

El proceso de esterilización fue exitoso dado que las cajas inoculadas con el agua del último enjuague no mostraron crecimiento de ningún microorganismo en ninguno de los tratamientos realizados.

En la Figura III-4 se observa el reisolamiento de los entomopatógenos mediante la técnica de inoculación utilizada.

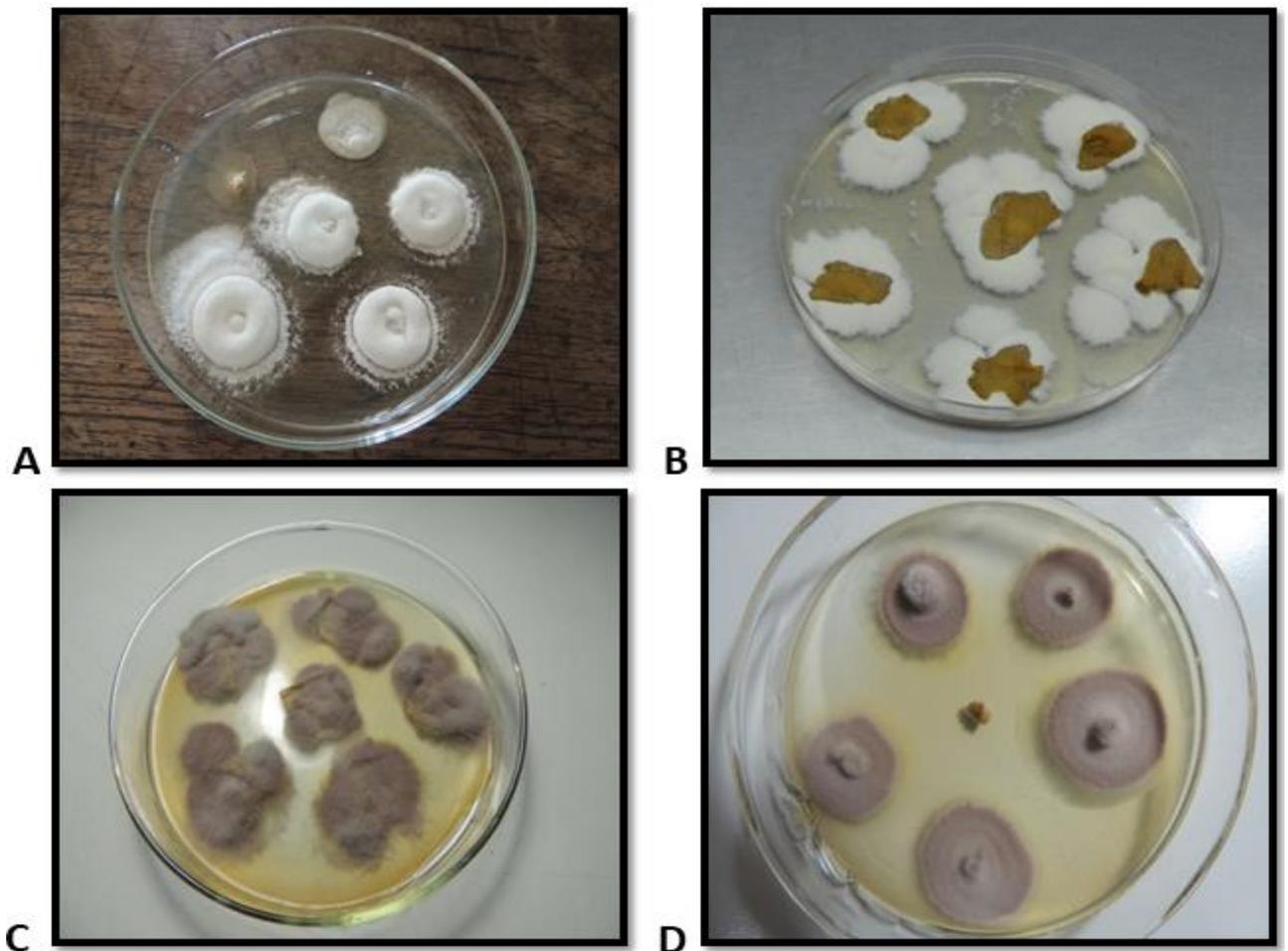


Figura III-4: Emergencia de *Beauveria bassiana* como endófito de muestras de tallo (A) y de muestras de hoja (B) de tabaco. Emergencia de *Paecilomyces lilacinum* de muestras de hojas (C) y de tallo (D) de tabaco.

El análisis estadístico para cada una de las especies de entomopatógenos arrojó diferencias significativas en raíces, tallos y hojas, para cada uno de los factores considerados (cepa y tiempo post-inoculación) así como también para la interacción entre ambos (tabla III- 1, 2 y 3).

Tabla III-1: Resultados del análisis (ANOVA) de los aislamientos realizados en raíz.

Raíz	variables	F	gl	p
<i>B. bassiana</i>	cepa	223,47	13	<0,0001
	tiempo	305,31	3	<0,0001
	cepa*tiempo	18,53	39	<0,0001
		F	gl	p
<i>P. lilacinum</i>	cepa	55,08	8	<0,0001
	tiempo	77,17	3	<0,0001
	cepa*tiempo	4,89	24	<0,0001
		F	gl	p
<i>M. anisopliae</i>	cepa	361,52	2	<0,0001
	tiempo	79,08	3	<0,0001
	cepa*tiempo	79,08	6	<0,0001

Tabla III-2: Resultados del análisis (ANOVA) de los aislamientos realizados en tallo.

Tallo	variables	F	gl	p
<i>B. bassiana</i>	cepa	163,74	13	<0,0001
	tiempo	224,73	3	<0,0001
	cepa*tiempo	13,78	39	<0,0001
		F	gl	p
<i>P. lilacinum</i>	cepa	103,63	8	<0,0001
	tiempo	153	3	<0,0001
	cepa*tiempo	10,68	24	<0,0001
		F	gl	p
<i>M. anisopliae</i>	cepa	16,44	2	<0,0001
	tiempo	16,44	3	<0,0001
	cepa*tiempo	16,44	6	<0,0001

Tabla III-3: Resultados del análisis (ANOVA) de los aislamientos realizados en hoja.

Hoja	variables	F	gl	p
<i>B. bassiana</i>	cepa	265,04	13	<0,0001
	tiempo	244,85	3	<0,0001
	cepa*tiempo	11,43	39	<0,0001
		F	gl	p
<i>P. lilacinum</i>	cepa	113,4	8	<0,0001
	tiempo	232,13	3	<0,0001
	cepa*tiempo	13,63	24	<0,0001
		F	gl	p
<i>M. anisopliae</i>	cepa	48,88	2	<0,0001
	tiempo	48,88	3	<0,0001
	cepa*tiempo	48,88	6	<0,0001

Todas las cepas de *B. bassiana* fueron capaces de colonizar endofíticamente las plantas de tabaco excepto las cepas LPSc 1365, LPSc 1214 y LPSc 1364. En los tres órganos estudiados, la cepa LPSc 1215 fue la que presentó los mayores porcentajes de colonización para cada uno de los tiempos evaluados, en raíz fueron de $88\% \pm 0,14$; $64\% \pm 0,11$; $57\% \pm 0,13$ y $42\% \pm 0,11$ a los 7, 14, 21 y 28 días respectivamente, en tallo $86\% \pm 0,15$; $76\% \pm 0,13$; $67,3\% \pm 0,08$ y $65,3\% \pm 0,1$, por último en hoja los valores fueron de $97\% \pm 0,04$; $91,1\% \pm 0,05$; $80,3 \pm 0,11$ y $77,9 \pm 0,11$ respectivamente (Figuras III-5, III-6 y III-7).

En lo que respecta a la raíz de las plantas (Figura III-5), a los 7 días post-inoculación la cepa LPSc 1211 presentó un porcentaje de colonización del $75\% \pm 0,08$, sin embargo a los 14 días fue la cepa LPSc 1213 la que presentó un mayor porcentaje de colonización ($58\% \pm 0,13$), respecto de las demás cepas. A los 21 días, la capacidad endofítica en raíz disminuye en la mayor parte de las cepas estudiadas, no superando el 50% de colonización (excepto, como se mencionó anteriormente, la cepa LPSc 1215), esta situación se repite a los 28 días posteriores a la inoculación con porcentajes aún más bajos, los cuales rondaron entre un 0 y un 42% de colonización.

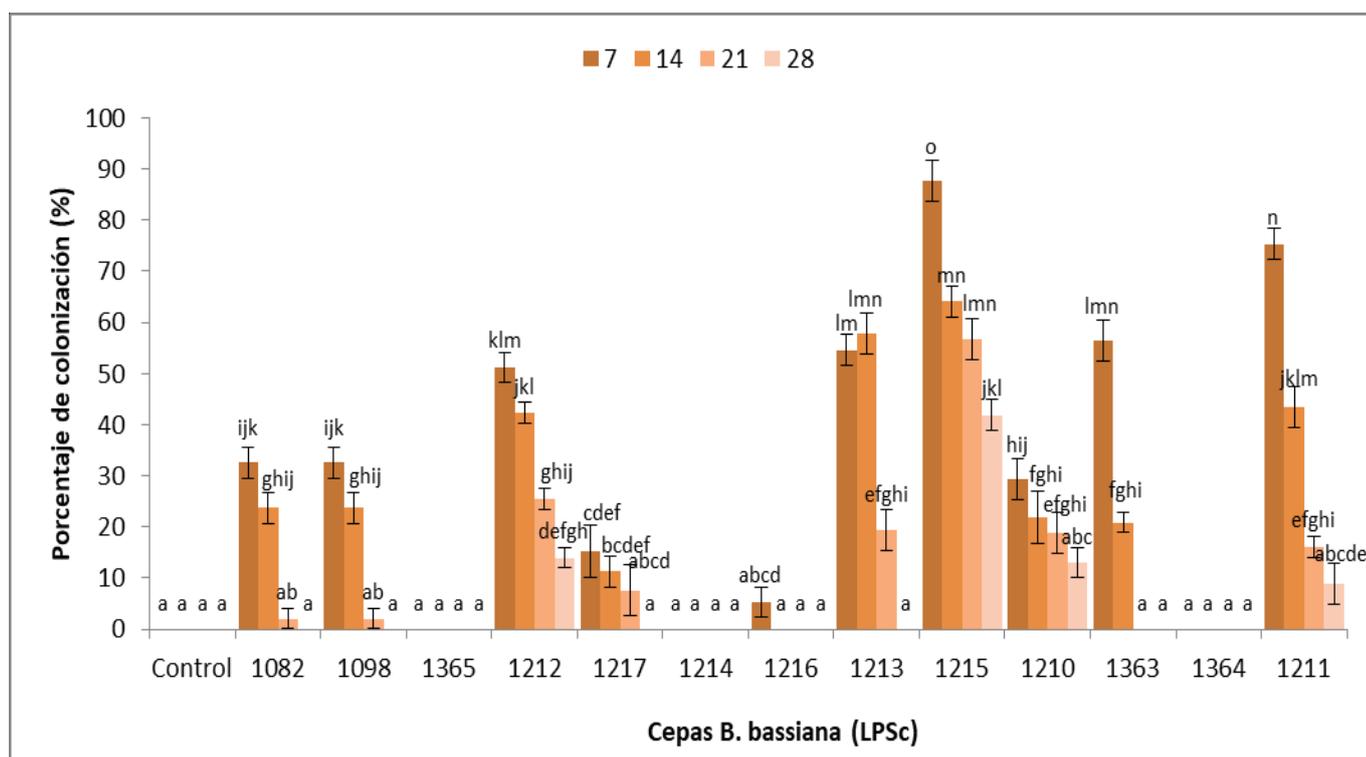


Figura III-5: Porcentajes de colonización en raíz por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, a distintos intervalos de tiempo (7, 14, 21 y 28 días).

Respecto del tallo de las plantas (Figura III-6) y como se mencionó anteriormente, la cepa LPSc 1215 fue la que presentó mejor capacidad endofítica en todos los intervalos de tiempo estudiados (86,3%, 76%, 67,3% y 65,3% a los 7, 14, 21 y 28 días). A los 7 días post-inoculación las cepas LPSc 1363 y LPSc 1211 mostraron valores de colonización del 85,4%±0,1 y 84,7%±0,09 respectivamente. A los 14 días, la cepa LPSc 1213 presentó un porcentaje de colonización del 67%±0,16. Posteriormente, a los 21 y 28 días post-inoculación los valores no superaron el 50% de colonización en las cepas estudiadas.

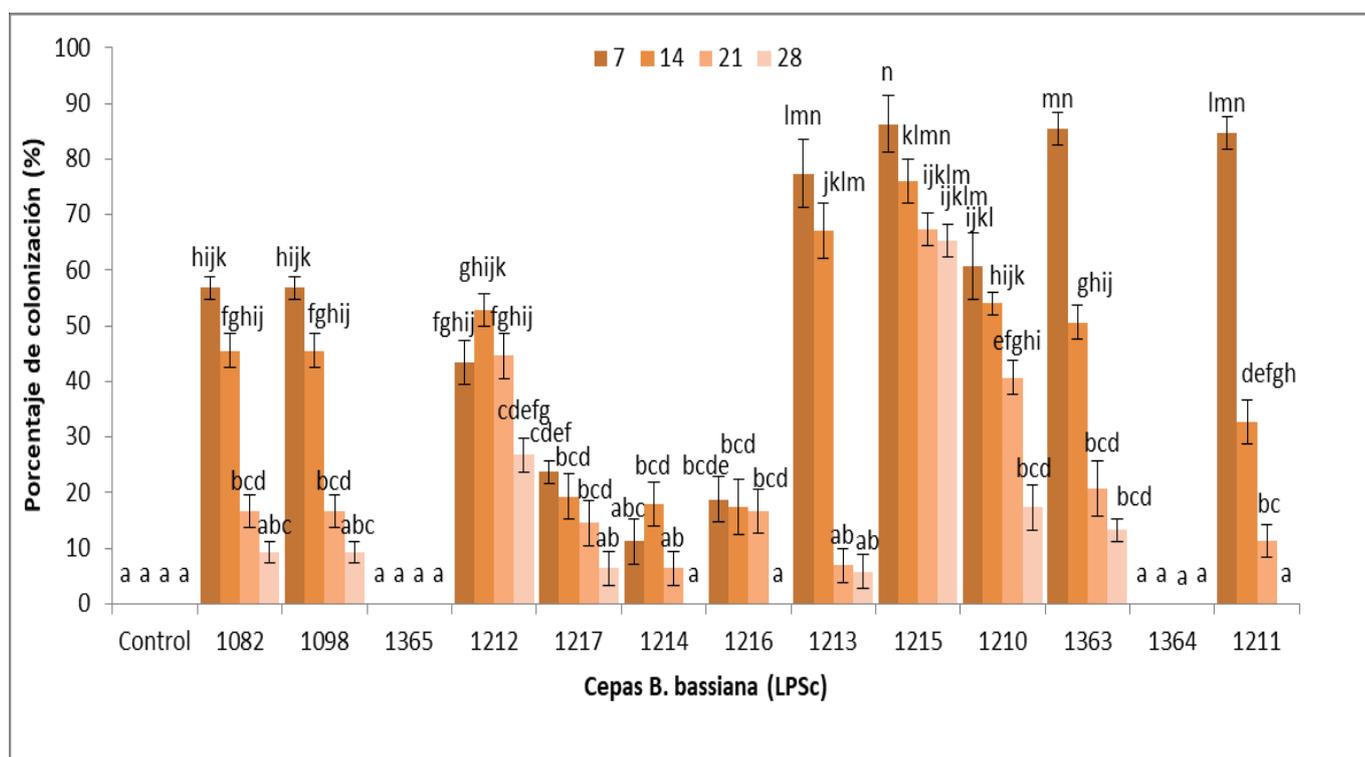


Figura III-6: Porcentajes de colonización en tallo por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, a distintos intervalos de tiempo (7, 14, 21 y 28 días).

La colonización de *B. bassiana* en hoja (Figura III-7) fue superior a la de los otros órganos de la planta de tabaco. En este caso, la cepa LPSc 1215 presentó también los mayores valores de colonización endofítica en todos los tiempos estudiados.

Para los 7 días posteriores al tratamiento las cepas LPSc 1210, LPSc 1363, LPSc 1213 y LPSc 1211 superaron el 80% de colonización con valores de $85,3\% \pm 0,13$, $85,3\% \pm 0,13$, $84,2\% \pm 0,15$ y $83,5\% \pm 0,13$ respectivamente. A su vez, las cepas LPSc 1098, LPSc 1082 y LPSc 1212 presentaron valores relativamente elevados de colonización ($61,7\% \pm 0,08$; $62\% \pm 0,08$ y $72,4\% \pm 0,13$ respectivamente). A los 14 días post-inoculación, la cepa LPSc 1363 mostró el mayor porcentaje de colonización $80,2\% \pm 0,04$. Por otro lado el porcentaje de colonización de las cepas LPSc 1082, LPSc 1098, LPSc 1212, LPSc 1213 y LPSc 1210 osciló entre un $77,7\% \pm 0,12$ para la cepa LPSc 1210 y un $62,6\% \pm 0,11$ para la cepa LPSc 1082. A los 21 días, sólo las cepas LPSc 1210 y LPSc 1212 mostraron los mayores porcentajes de colonización ($66,7\% \pm 0,09$ y $64,5\% \pm 0,11$ respectivamente), por otro lado las cepas LPSc 1364 y LPSc 1365 no pudieron re-aislarse en este tiempo. A los 28 días post-inoculación, los porcentajes de colonización de las distintas cepas utilizadas en el presente estudio, fue relativamente bajo, excepto la cepa LPSc 1215 cuyo porcentaje de colonización fue del $77,9\% \pm 0,11$ y nuevamente las cepas LPSc 1364 y LPSc 1365 no pudieron ser re-aisladas.

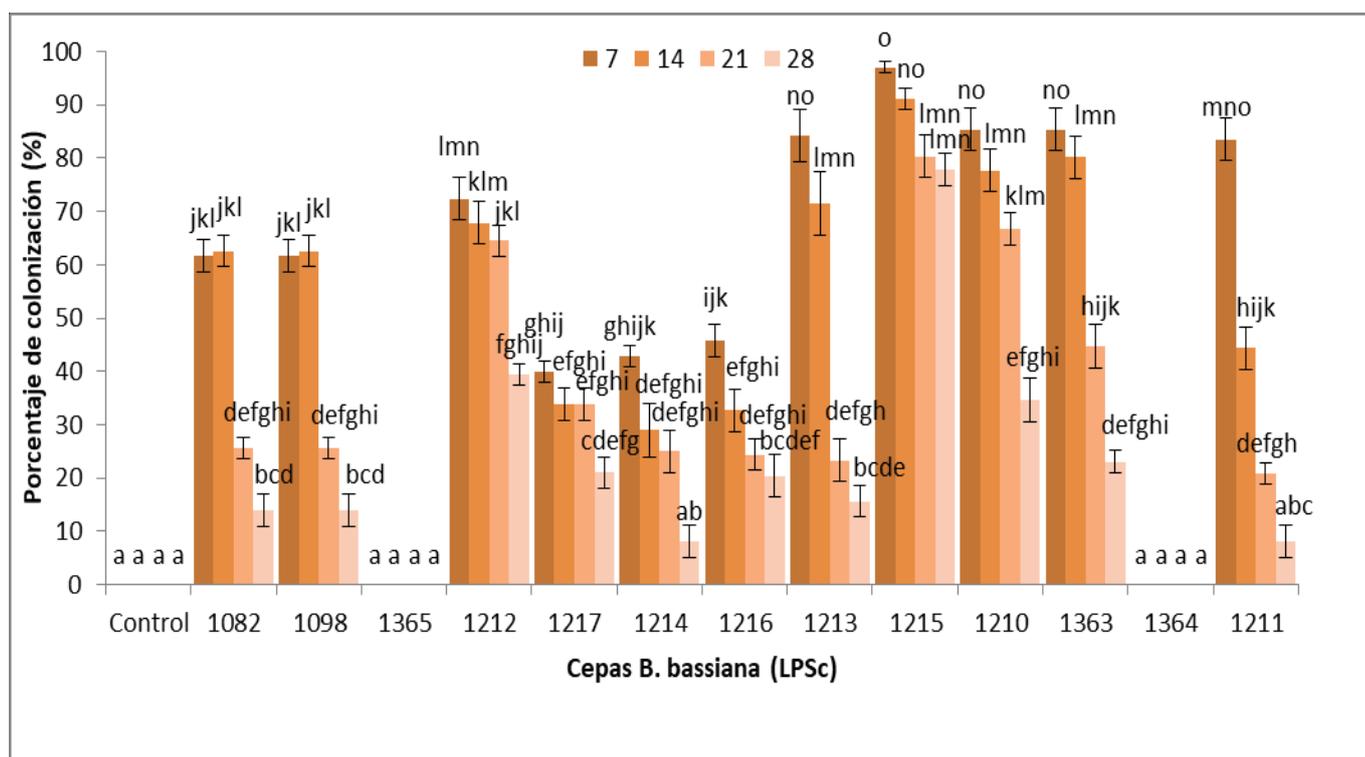


Figura III-7: Porcentajes de colonización en hoja por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, a distintos intervalos de tiempo (7, 14, 21 y 28 días).

Todas las cepas de *P. lilacinum* estudiadas pudieron recuperarse de los distintos órganos de las plantas de tabaco inoculadas, excepto la cepa LPSc 1371 la cual no logró ser re-aislada en raíz (Figuras III-8, III-9 y III-10).

A los 7 días post-inoculación con *P. lilacinum*, las raíces de las plantas de tabaco fueron colonizadas en porcentajes superiores al 50% sólo por las cepas LPSc 1367, LPSc 1374 y LPSc 1368 ($55\% \pm 0,12$, $53\% \pm 0,14$ y $52\% \pm 0,15$ respectivamente) y la cepa LPSc 1371 no logró ser re-aislada (Figura III-8). A los 14 días, las cepas LPSc 1368, LPSc 1374 y LPSc 1367 presentaron valores de colonización endofítica de $37\% \pm 0,12$, $36\% \pm 0,16$ y $35\% \pm 0,9$ respectivamente) pero fueron las únicas en superar el 30%. A los 21 días la colonización es aún menor para todos los aislamientos con valores que no superan el 20%, sólo la cepa LPSc 1368 logró colonizar el $32\% \pm 0,03$ de las raíces. La cepa LPSc 1367 fue la que mayor colonización exhibió con un valor de $15\% \pm 0,19$ a los 28 días post-inoculación.

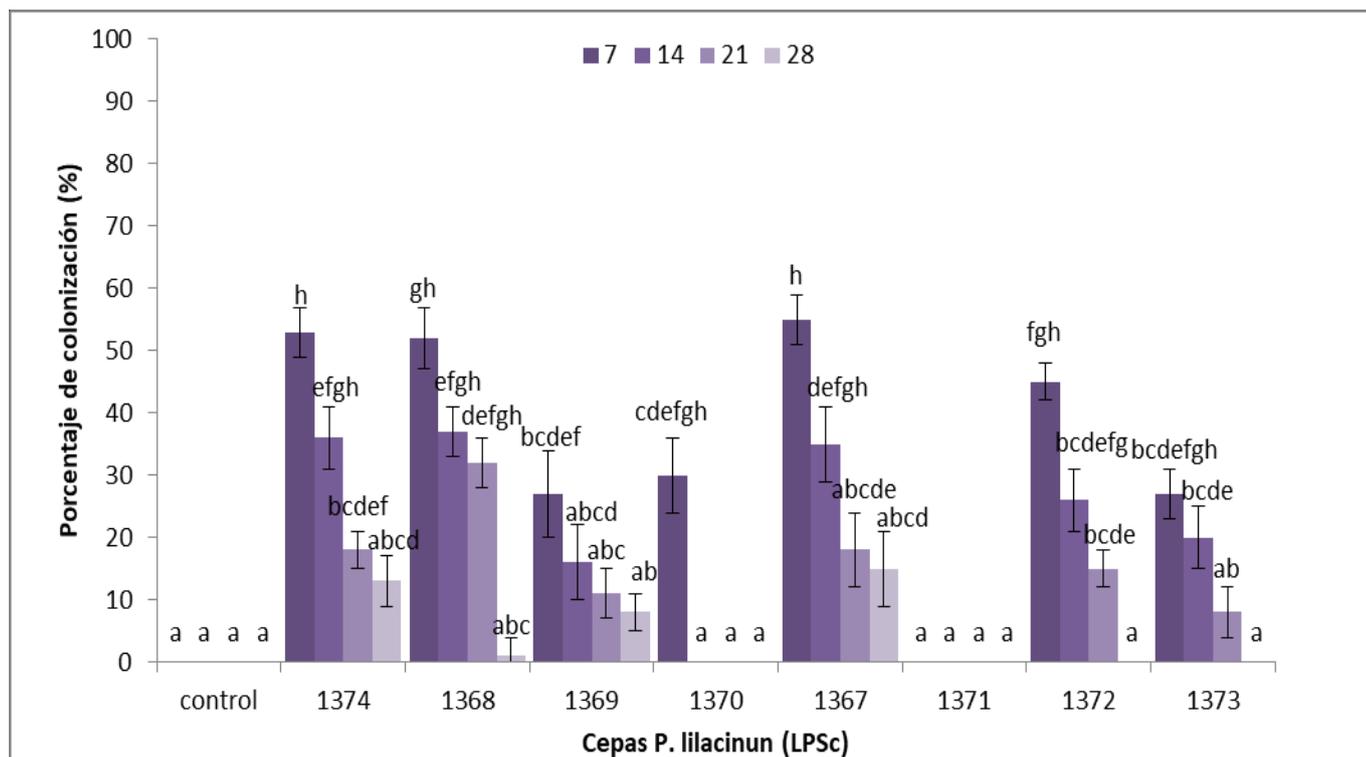


Figura III-8: Porcentajes de colonización en raíz por el hongo entomopatógeno *Purpureocillium lilacinum*, a distintos intervalos de tiempo (7, 14, 21 y 28 días).

A los 7 días posteriores a la inoculación, las cepas que exhibieron los mayores porcentajes de colonización a nivel del tallo fueron LPSc 1370, LPSc 1368, LPSc 1374, LPSc 1367 y LPSc 1372 ($72\% \pm 0,11$, $70\% \pm 0,13$, $66\% \pm 0,13$, $63\% \pm 0,14$ y $53\% \pm 0,11$ respectivamente) (Figura III-9). A los 14, 21 y 28 días post-inoculación la cepa LPSc 1374 fue la que mayores porcentajes de colonización mostró, con valores de $62\% \pm 0,13$, $56\% \pm 0,11$ y $36\% \pm 0,16$ respectivamente.

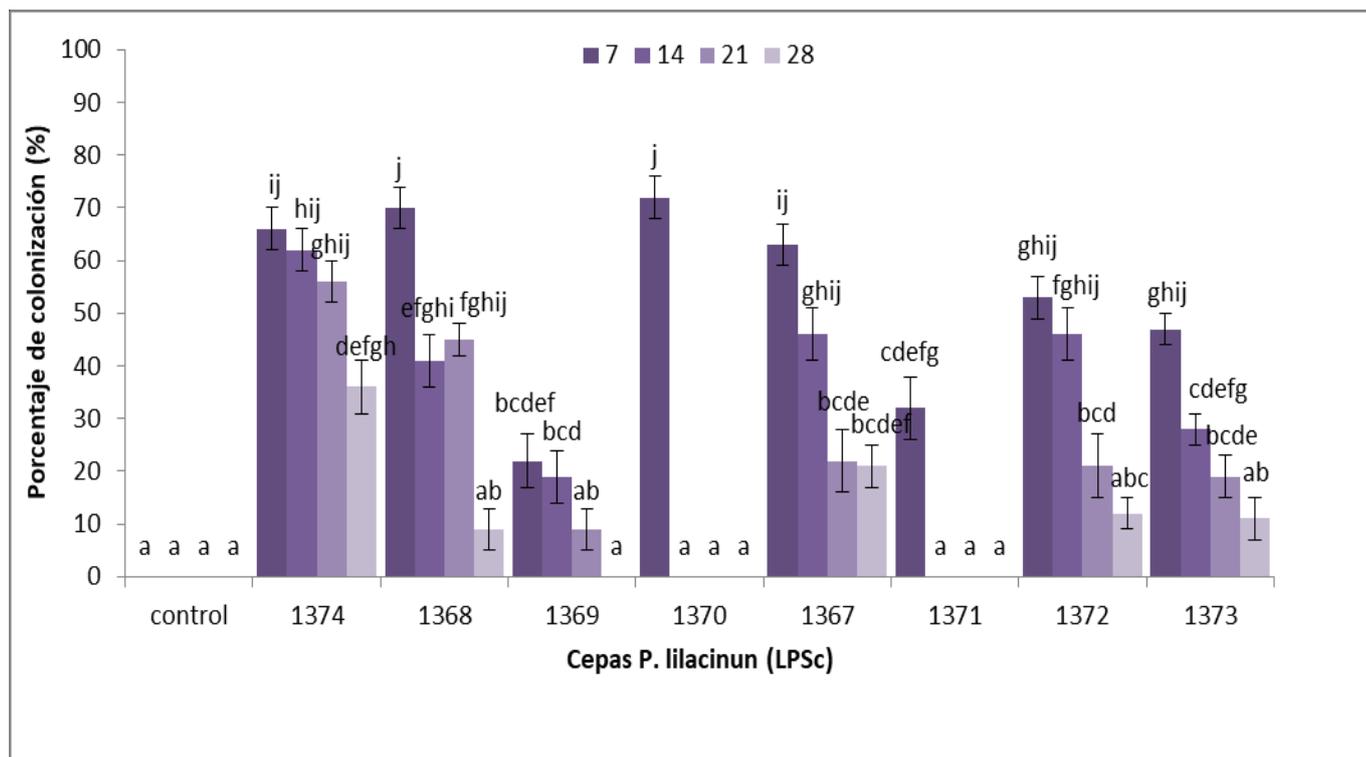


Figura III-9: Porcentajes de colonización en tallo por el hongo entomopatógeno *Purpureocillium lilacinum*, a distintos intervalos de tiempo (7, 14, 21 y 28 días).

En lo que respecta a las hojas de las plantas de tabaco (Figura III-10) se observó que a los 7 días post-inoculación, todas las cepas de *P. lilacinum* mostraron valores superiores al 70% de colonización, excepto en las cepas LPSc 1369 y LPSc 1371 con valores del $47\% \pm 0,9$ y $47\% \pm 0,89$. A los 14 días posteriores a la inoculación, las cepas LPSc 1370, LPSc 1371 y LPSc 1369 mostraron los menores porcentajes de colonización (0% , $18\% \pm 0,14$ y $30\% \pm 0,19$ respectivamente) por el contrario las cepas LPSc 1374 con un $76\% \pm 0,14$; LPSc 1372 con un $68\% \pm 0,13$ y la LPSc 1368 con un $64\% \pm 0,16$ exhibieron los mayores porcentajes de colonización. A los 21 días, la cepa LPSc 1374 alcanzó el mayor porcentaje de colonización con un $64\% \pm 0,11$ en hoja. Por último, a los 28 días post-inoculación, todas las cepas exhibieron colonizaciones inferiores al 50%, siendo la cepa LPSc 1374 la que mayor porcentaje de colonización mostró con un $48\% \pm 0,15$.

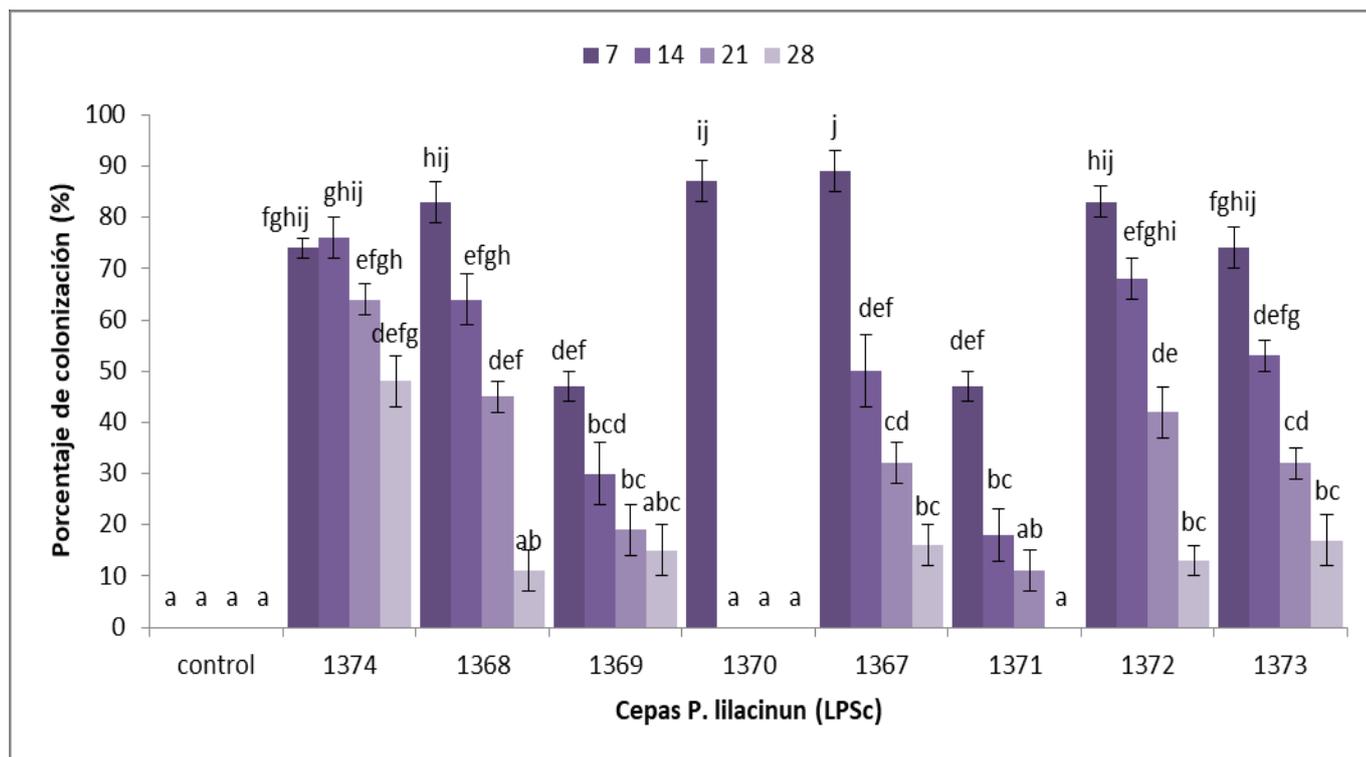


Figura III-10: Porcentajes de colonización en hoja por el hongo entomopatógeno *Purpureocillium lilacinum*, a distintos intervalos de tiempo (7, 14, 21 y 28 días).

En lo que respecta al hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, la cepa LPSc 1366 obtenida en cultivos de tabaco de Jujuy logró colonizar endofíticamente las plantas de tabaco en las cuales fue inoculado, presentando a los 7 días post-inoculación porcentajes de colonización del 65%_{0,1}, 48%_{0,12} y 10%_{0,14} en raíz, tallo y hoja respectivamente. Particularmente para la raíz (Figura III-11), estos valores disminuyen al transcurrir el tiempo, para finalmente a los 28 días no registrarse colonización. En cambio para los órganos tallo y hoja (Figuras III-12 y III-13) no se observaron fragmentos colonizados con posterioridad a la semana de inoculación. La cepa LPSc 907 proveniente de la colección micológica, no logró colonizar endofíticamente ninguno de los órganos de las plantas de tabaco inoculadas (Figuras III-11, III-12 y III-13).

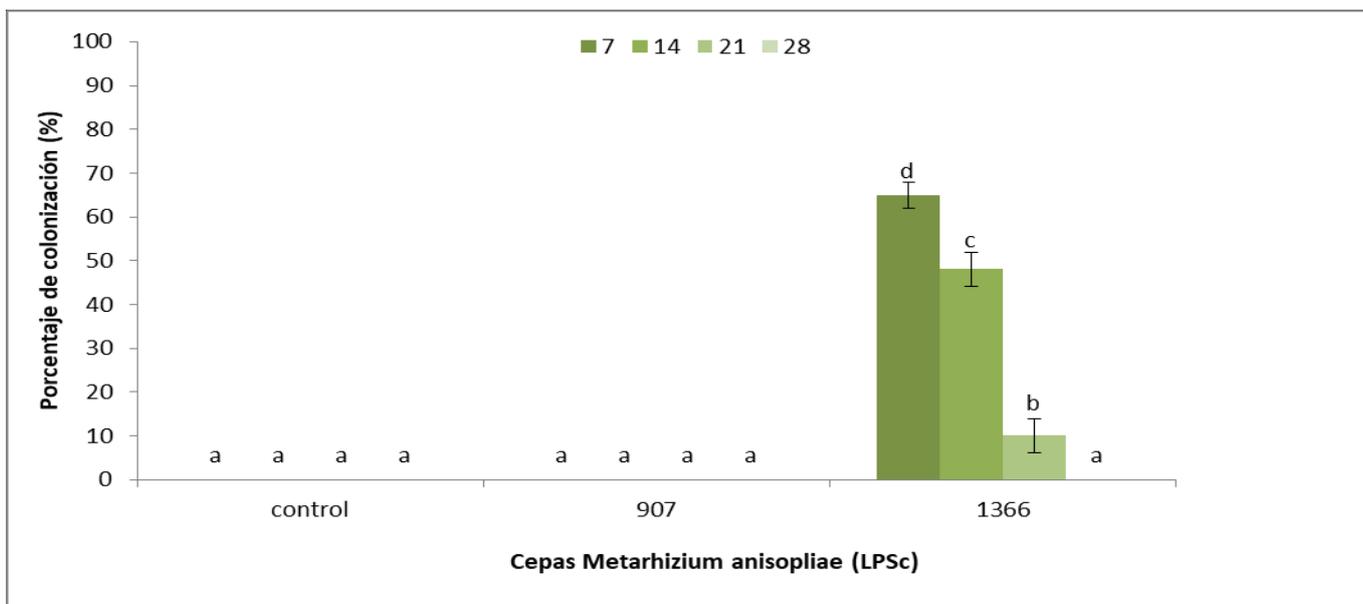


Figura III-11: Porcentajes de colonización en raíz por el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, a distintos intervalos de tiempo (7, 14, 21 y 28 días).

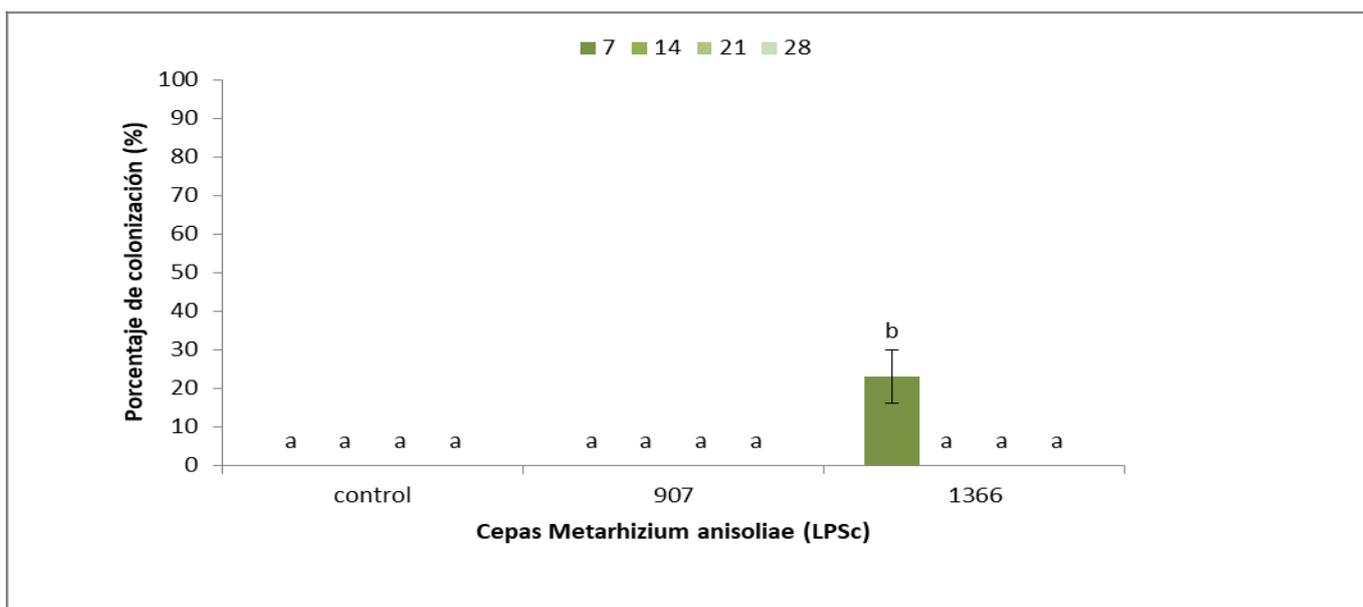


Figura III-12: Porcentajes de colonización en tallo por el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, a distintos intervalos de tiempo (7, 14, 21 y 28 días).

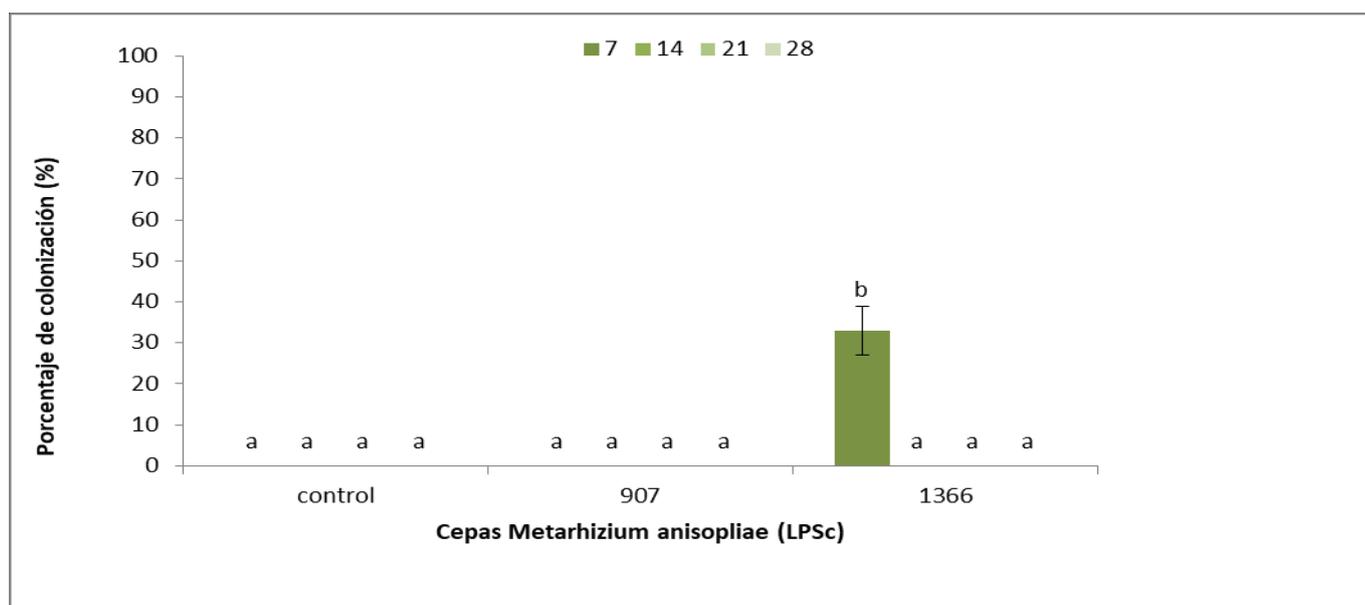


Figura III-13: Porcentajes de colonización en hoja por el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, a distintos intervalos de tiempo (7, 14, 21 y 28 días).

Discusión

Cuando se busca establecer un entomopatógeno como endófito, diversos son los factores que pueden afectar el éxito experimental en la colonización. Entre ellos pueden mencionarse la técnica de inoculación, la concentración del inóculo, aspectos biológicos como la especie vegetal y su estado de desarrollo, las condiciones en la que se la siembra, así como también la especie fúngica a inocular.

En este capítulo se demostró que la técnica de aspersión foliar es efectiva para establecer distintas especies de hongos entomopatógenos como endófitos en plantas de tabaco. Distintas técnicas han sido utilizadas en distintas especies vegetales para el antes mencionado propósito, por ejemplo se han obtenido buenos porcentajes de recuperación de los hongos inoculados (dos meses después), que oscilaron entre el 100% al 33,3%, utilizandola técnica de inyección en tallo en plantas de café (Posada et al. 2007). También, mediante la aspersión de semillas Jaber (2018) logró establecer *B. bassiana* y *M. brunneum* como endófito en plantas de trigo y demostrar además la capacidad de estos hongos entomopatógenos para promover el crecimiento y servir como antagonistas de patógenos. Sin embargo, la técnica más ampliamente difundida para la aplicación de endófitos fúngicos es la aspersión foliar. Esta técnica ha permitido establecer la mayor cantidad de especies de hongos en diversas especies vegetales, obteniendo los mejores resultados de colonización. En este sentido, se pueden mencionar por ejemplo los trabajo realizados por Tefera &

Vidal (2009) en sorgo, por Gurulingappa et al. (2010) en maíz y Parsa et al. (2013) en habas. Particularmente para *N. tabacum* Russo et al. (2015) estudiaron la colonización endofítica por la cepa de *B. bassiana* LPSc 1067, mediante tres técnicas de inoculación (aspersión foliar, inoculación de semillas e inmersión de raíz). La inoculación de semillas y la inmersión de raíz no resultaron ser efectivas para la colonización de las plantas, por parte del hongo entomopatógeno. Sin embargo, la técnica de aspersión foliar fue aquella que permitió a estos autores establecer con mayor éxito el entomopatógeno en tabaco, obteniendo porcentajes de recuperación del 100% a los 7 días post-inoculación pero, que con el tiempo estos valores decrecieron, hasta llegar a un 2,2% a los 28 días post-inoculación. En este estudio, la cepa de *B. bassiana* LPSc 1215 aislada de suelo en la Provincia de Jujuy, Argentina, fue la que mayor capacidad endofítica mostró en hoja, tallo e incluso en raíz. Los valores de colonización obtenidos para esta cepa disminuyeron con el tiempo pero incluso a los 28 días post-inoculación los valores de recuperación permanecieron elevados especialmente en hojas ($42\% \pm 0,11$; $65,3\% \pm 0,1$ y $77,9 \pm 0,11$ en raíz tallo y hoja respectivamente).

Es importante mencionar que, la situación ideal a alcanzar cuando se utiliza cualquier técnica de inoculación es lograr una colonización sistémica del microorganismo, sin embargo lo que suele ocurrir es que la colonización es mayor en aquél órgano en el que se aplica el tratamiento de conidios (Parsa et al. 2013). Por ejemplo, Posada et al. (2007) reportaron que en plantas de café la aspersión foliar favorece la colonización en hojas y que la aplicación en suelo resulta en mayores colonizaciones de las raíces; situación similar fue reportada por Parsa et al. (2013) en plantas de *Phaseolus vulgaris*. En lo que respecta a este estudio, el mismo patrón fue observado para *B. bassiana* y *P. lilacinum* ya que en términos generales las cepas de estos entomopatógenos mostraron mayor capacidad de colonizar las hojas y tallos de las plantas de tabaco, obteniéndose en cambio valores bajos de colonización en raíces. Sin embargo, la cepa LPSc1366 de *M. anisopliae* obtenida a campo en este estudio, que fue la única cepa de la especie en demostrar capacidad endofítica, colonizó preferentemente las raíces aunque estos valores también disminuyeron con el transcurrir del tiempo para finalmente a los 28 días no registrarse dicha cepa como endófito. Distintas especies del género *Metarhizium* son consideradas vinculadas naturalmente a la rizósfera (Meyling et al. 2011), así han sido reportadas colonizando células corticales de la raíz, pero que no han migrado a otros órganos de las plantas (Gurulingappa et al. 2010; Sasan & Bidochka 2012). Por otro lado varios autores han reportado su presencia en hojas y tallos además de las raíces luego de su aplicación foliar (Resquín-Romero et al. 2016, Batta 2013). Una posible explicación para estos resultados tan dispares es brindada por Behie et al. (2015), que explica que la colonización diferencial en raíces, tallos y hojas por hongos endófitos, reflejaría diferencias en el ambiente externo y en las condiciones bióticas de los distintos órganos. En base a estos resultados podría

establecerse que la elección del método de inoculación debe ser planificada en función del objetivo (por ejemplo la localización del patógeno que se desea combatir o el órgano que ataca un determinado herbívoro).

Otro hecho que se deriva del presente capítulo, es que los hongos entomopatógenos pueden establecerse como endófitos en hojas, tallos y raíces de las plantas de tabaco. Sin embargo la capacidad de colonizar dichos órganos, dependió de la cepa y del tiempo post-inoculación. Posada et al. (2007) reportaron bajos porcentajes de colonización de *B. bassiana* en hojas de café, esto difiere con lo que pudo ser observado en este estudio en plantas de tabaco. Estos autores atribuyen la baja colonización de hojas de café a la composición de la cutícula de las hojas y además a la posición de los estomas y domatia en la superficie abaxial, que son posibles vías de entrada directa de los conidios del hongo a las plantas. Al realizar la inoculación en la superficie adaxial de las hojas los autores no habrían favorecido la germinación y penetración de los conidios, obteniendo así una baja recuperación del hongo en este órgano.

El hecho de que sea posible aislar las diferentes especies de hongos entomopatógenos de distintos órganos de las plantas de tabaco, aunque la inoculación se realice en hoja, indica que dichos hongos pueden migrar a lo largo de la planta. Las diferencias en los porcentajes de colonización entre los diferentes tejidos podría deberse a diferencias microbiológicas y fisiológicas en cada uno de ellos, y a que particularmente cada cepa puede presentar especificidad para cada una de las condiciones halladas en los diferentes órganos (Petrini & Fisher 1987).

Las distintas especies de entomopatógenos mostraron capacidades diferentes para colonizar las plantas de tabaco. Las cepas de *B. bassiana* mostraron las mayores frecuencias de colonización, seguidas por las de *P. lilacinum*. En cambio sólo una cepa de *M. anisopliae* (LPSc 1366) fue capaz de colonizar endofíticamente las plantas de tabaco. Esta cepa fue aislada de suelos de fincas tabacaleras, invadiendo preferentemente las raíces de la planta. La habilidad de las diferentes cepas para la colonización endofítica parecería ser una característica propia del genotipo de cada una para la vida endofítica y debería ser evaluada previo a la selección de las mismas (Vega 2018). De modo general, se observó una tendencia de las cepas nativas aisladas del suelo de las fincas de Jujuy, particularmente de las especies *B. bassiana* y *P. lilacinum*, a colonizar más exitosamente las plantas de tabaco. Numerosos trabajos científicos reportan sobre la pérdida de viabilidad y virulencia de los hongos entomopatógenos cuando son sucesivamente repicados en medios artificiales para preservarlos en colecciones científicas (Butt et al. 2006). Siempre resulta de interés contar con cepas autóctonas de organismos de control biológico ya que éstas llevan largos períodos subsistiendo en un ambiente al que se han adaptado de manera exitosa, los mecanismos necesarios para enfrentar adversidades ambientales están presentes en su información genética. Contar con un

organismo de control que sea capaz de permanecer en el ambiente es fundamental para garantizar el éxito de control de las plagas a largo plazo.

Otro aspecto a considerar es lo que ocurre con la persistencia de los entomopatógenos como endófitos en el tiempo. En general, se observa una disminución en el porcentaje de colonización con el transcurso del tiempo, esto fue reportado por Herrero et al. (2013) para *Tolypocladium cylindrosporum* y es lo que ocurre para las cepas de las tres especies de entomopatógenos aquí estudiadas. Arnold et al. (2003) plantean que las relaciones de mutualismo que ocurren en el huésped entre los endófitos inoculados y aquellos transmitidos horizontal o verticalmente podrían afectar la recuperación de las cepas de interés. Esta podría ser una posible explicación a lo que ocurre en plantas de tabaco, constituyendo una hipótesis que a futuro debería ser confirmada.

CAPÍTULO 4

Preferencia alimenticia y efectos sub-letales de *Beauveria bassiana* como endófito sobre plagas del tabaco.



Objetivo

Evaluar la preferencia alimenticia y efectos sub-letales de los insectos plaga del cultivo de tabaco que se alimenten de plantas tratadas con la cepa de hongo entomopatógeno con mejor capacidad endofítica.

Introducción

Diferentes especies de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams y *Purpureocillium* spp (Ascomycota: Hypocreales) han sido introducidas como endófitos en una amplia variedad de plantas (Vega et al. 2008) y son considerados como endófitos no Clavicipitaceae Clase 2, ya que pueden ser transferidos horizontalmente (Rodríguez et al. 2009). Estos microorganismos no sólo cumplirían un rol como agentes de control de insectos si no también podrían actuar promoviendo el crecimiento y rendimiento vegetal y también confiriendo protección frente a fitopatógenos (Vega et al. 2009).

Los hongos entomopatógenos como endófitos son conocidos por colonizar diversos tipos de cultivos hortícolas y agrícolas, confiriendo protección del daño provocado por herbívoros y también regulando las poblaciones de insectos. Powel et al. (2007) reportaron reducción del daño provocado por *Helicoverpa zea* en plantas de tomate que se encontraban inoculadas con el hongo *B. bassiana*. A su vez, Gurulingappa et al. (2011) y Hernawati et al. (2011) demostraron que los hongos entomopatógenos como endófitos de cultivos hortícolas reducen el crecimiento y la fecundidad de *Aphis gossypii*. A su vez, el ciclo de vida y la fecundidad de *Helicoverpa armigera* ha sido afectado por *Acremonium strictum* W. Gams (Ascomycota: Hypocreales) como endófito (Jaber & Vidal 2010). Resultados similares fueron observados por Pelizza et al. (2017), quienes inocularon plantas de *Zea mays* con el hongo entomopatógeno *B. bassiana* y observaron que las ninfas de la tucura plaga *Dichroplus maculipennis* (Orthoptera: Acrididae), preferían consumir las plantas control de maíz, es decir aquellas que no presentaban a *B. bassiana* como endófito.

Los gusanos cogolleros pertenecen a un complejo de especies generalistas que se alimentan de la porción apical de las plantas, donde se encuentran los tejidos meristemáticos, causando significativas pérdidas en el rendimiento de los cultivos. La familia Noctuidae dentro de los lepidópteros, es aquella que incluye a la mayoría de las especies de gusanos cogolleros y la que por lo tanto alberga el mayor número de especies de relevancia económica (Herrero et al. 2018).

Helicoverpa gelotopoeon (D.) (Lepidoptera: Noctuidae) es nativa de América, pertenece a este complejo, y es una especie de insecto plaga que recientemente se ha expandido de manera rápida en Argentina, afectando numerosos cultivos como soja, algodón, lino, alfalfa y tabaco (Delgado & Fedre 2003; Herrero et al. 2018) (Figura IV-1). Las larvas pueden diferenciarse morfológicamente de otras especies ya que presentan el último segmento abdominal terminando a 45° respecto del eje del cuerpo, poseen 5 pares de pseudoapéndices y el cuerpo cubierto por “pelos” dorsales y ventrales alargados y de color blanco. Otro rasgo característico de la especie es que las larvas presentan una banda blanca a los flancos del cuerpo. La coloración de los estadios inmaduros depende del material vegetal que consumen, es por ello que puede variar entre amarilla, verde o marrón oscuro.

El ciclo completo de *H. gelotopoeon* comprende unos 46 días (Figura IV-2). El período de incubación de los huevos es de 3 a 5 días, seguido por cinco estadios larvales que luego de 14 a 20 días empupan en el suelo durante 11 días. Los adultos viven aproximadamente 17 días, en este período las hembras llegan a oviponer entre 300 y 1000 huevos de manera aislada sobre las hojas (Herrero et al. 2018).

Las estrategias de control para los lepidópteros plaga implican de modo casi exclusivo el empleo de insecticidas químicos, con el gran problema que trae esto aparejado a la salud de los productores tabacaleros y la contaminación del medio ambiente que ocasiona (Gonzales et al. 2010).

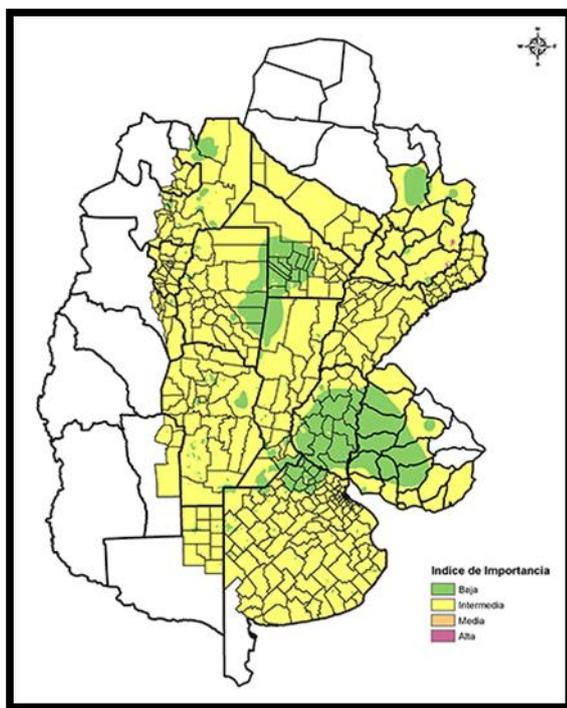


Figura IV-1: Mapa de importancia de *Helicoverpa gelotopoeon* en la Argentina (<http://www.intactarr2pro.com.ar/ver-plaga-helicoverpa-gelotopoeon-oruga-bolillera-7>).

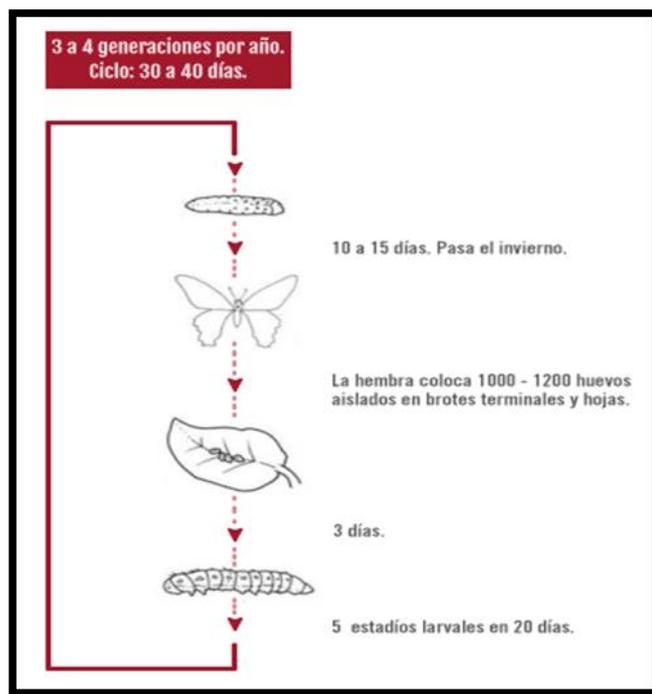


Figura IV-2: Ciclo de vida de *Helicoverpa gelotopoeon*. (<http://www.intactarr2pro.com.ar/ver-plaga-helicoverpa-gelotopoeon-oruga-bolillera-7>)

Las “vaquitas” fitófagas, son un grupo de coleópteros de la Familia Chrysomelidae ampliamente distribuido en el continente americano. Presentan su mayor diversidad en las áreas tropicales a templadas de América del Sur, contando con 13 géneros descritos (Cabrera Walsh &

Cabrera 2004). Constituyen un grupo de gran interés taxonómico y ecológico, tanto por su gran diversidad, como por su estrecha asociación con sus plantas hospederas, a las cuales atacan produciendo importantes mermas en la producción, ocasionando así grandes pérdidas económicas a los productores.

El género *Diabrotica* es uno de los más diversos y es el que mayor número de especies plaga presenta dentro de la Familia. Muchas de estas especies son plagas importantes de cultivos extensivos e intensivos, ya sea por los individuos adultos comedores de follaje, flores y frutos, o por las larvas que son hipógeas y comen las raíces de las plantas. Además de los daños directos provocados a los cultivos existen estudios que mencionan a los distintos estadios de esta especie como vectores de virus y enfermedades bacterianas (Laumann et al. 2003; Mauck & Shapiro 2018).

El ciclo de vida de esta especie se muestra en la Figura IV-3. Los huevos eclosionan luego de 5-7 días. El ciclo larval comprende unos 14- 26 días y consta de tres estadios que varían en su coloración del blanco al amarillo a medida que maduran. Las pupas son exaradas y en este estadio los sexos pueden diferenciarse por la presencia de dos papilas en la cara ventral del abdomen en la hembra, que están ausentes en los machos (Pecchioni 1988). Los adultos viven por unos 40-60 días; las hembras, que son más longevas que los machos, ponen unos 1000 huevos durante el período de oviposición y lo hacen en grietas y sitios en el suelo con abundante materia orgánica (Milanez 1997).

A lo largo de los años se han utilizado una gran variedad de métodos químicos y de manejo de la tierra por parte de los productores, para preservar altos rindes en los cultivos afectados. Algunos de los manejos utilizados son: la rotación de cultivos para evitar la reinfección de los mismos, sobre todo en las especies que presentan diapausa embrional; aspersiones de insecticidas para la eliminación de adultos; y principalmente dosis masivas de insecticidas de suelo incluidas en el laboreo del suelo para controlar las larvas (Cabrera & Cabrera Walsh 2004).

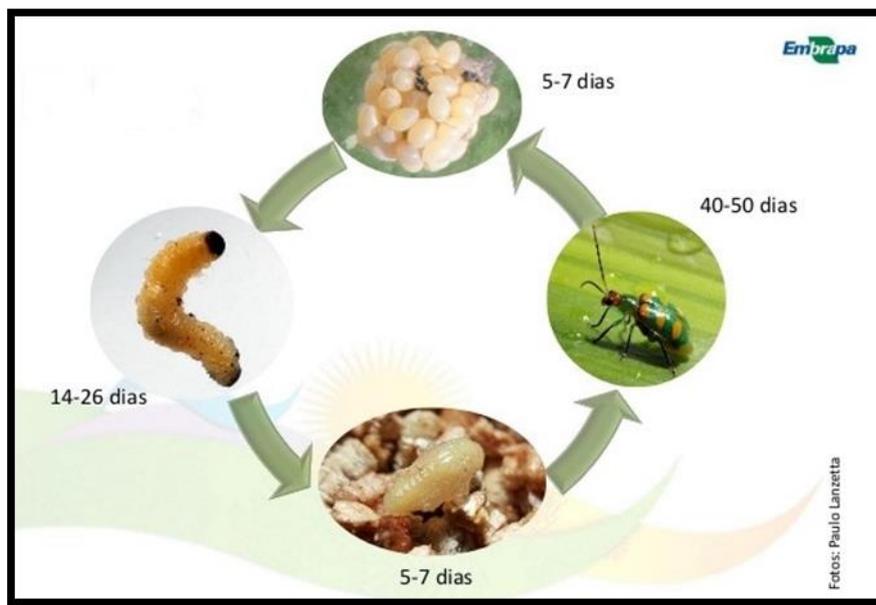


Figura IV-3: Ciclo de vida de *Diabrotica speciosa* (<https://pt.slideshare.net/Sofiaiba/biosegurana-2012-1>).

En la actualidad, es imperioso el desarrollo de nuevas estrategias de control amigables con el medio ambiente para mejorar la protección vegetal y aumentar el rendimiento de los cultivos. En ese sentido, la utilización de los hongos entomopatógenos como endófitos es una nueva y prometedora perspectiva (Lacava & Azevedo 2014; Bamisile et al. 2018).

Cuando se desea desarrollar estrategias de Manejo Integrado de Plagas, resulta de trascendencia realizar estudios de la biología de los insectos y su interacción con entomopatógenos y plantas.

En el presente capítulo se evaluó el efecto del hongo entomopatógeno *B. bassiana* como endófito, sobre diferentes parámetros biológicos y reproductivos de *H. gelotopoeon* al alimentarse de plantas de tabaco colonizadas por el hongo. Además se evaluaron los efectos de *B. bassiana* como endófito sobre la preferencia alimenticia de dos de las principales plagas del cultivo de tabaco, *H. gelotopoeon* y *D. speciosa*.

Materiales y Métodos

Preparación del cultivo fúngico y obtención del cultivo

Se seleccionó para este estudio la cepa LPSc 1215 (número de acceso GenBank MH050802) de *B. bassiana* aislada de suelos tabacaleros y de probada capacidad endofítica. La suspensión de

conidios a inocular y la obtención de las plantas para los bioensayos se realizaron de acuerdo a la metodología empleada en el Capítulo 3 de la presente Tesis Doctoral. Los bioensayos fueron realizados con aquellas plantas que presentaron tasas de colonización endofítica superiores al 80%.

Insectos

Helicoverpa gelotopoeon

Se obtuvieron huevos de *H. gelotopoeon*, provistos por el Instituto de Investigación Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA) INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina, para establecer una colonia en el laboratorio.

Las larvas se alimentaron *ad-libitum* con dieta artificial realizada según Patana (1977), y se criaron bajo condiciones controladas en cámara de cría ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 70% HR, con un fotoperíodo de 14:10 L: O). Una vez alcanzado el estadio de pupa, estas fueron colocadas en contenedores plásticos (1000 cm^3) y luego cambiadas a contenedores similares al alcanzar el estadio de adulto. Estos fueron provistos de una solución azucarada como alimento y de porciones de papel para promover la oviposición. Esta primera generación de laboratorio fue mantenida en potes plásticos (500 cm^3) conteniendo dieta artificial hasta el tercer estadio larval. Las larvas fueron individualizadas y aisladas en cajas de Petri plásticas.

La generación F1 fue la que se utilizó para el Bioensayo 1. Para el estudio del ciclo de vida y parámetros biológicos (Bioensayo 3) se individualizaron 200 huevos en cajas plásticas.

Diabrotica speciosa

Los adultos de *D. speciosa* fueron colectados a campo de manera manual mediante la utilización de pinzas entomológicas, acondicionados en tubos de vidrio esterilizados y trasladados al laboratorio donde se los mantuvo en observación durante 15 días para descartar la presencia de cualquier patología previa contraída en el campo de acuerdo a Pilz et al. (2007). Durante este periodo los adultos fueron alimentados con hojas de tabaco frescas y se les proveyó además algodones impregnados con una solución azucarada como suplemento alimenticio.

Bioensayo 1: Efecto de *B. bassiana* como endófito sobre la preferencia alimenticia de las larvas de *H. gelotopoeon*.

Se determinó el efecto de *B. bassiana* como endófito sobre la preferencia alimenticia de los insectos (Choice test). Larvas de tercer estadio fueron colocadas individualmente en cajas plásticas de Petri. Se les ofrecieron dos discos de hojas de tabaco (25 mm de diámetro), uno proveniente de plantas colonizadas con el hongo y otro proveniente de plantas control (no inoculadas, sin *B. bassiana* como endófito) (Napal et al. 2009; Gurulingappa et al. 2010) (Figura IV-4). Los discos de hojas fueron colocados sobre papel de filtro estéril humedecidos con agua destilada estéril para evitar la desecación del tejido foliar.

Luego de 24 hs de adicionar las larvas a las cajas de Petri y ofrecerles como único alimento los discos tratados y control, dichos discos fueron retirados de la caja y escaneados individualmente. Se calculó el área foliar consumida para cada disco utilizando el programa Image J (Bailer 2006). Se realizaron 30 repeticiones. El experimento fue repetido tres veces en el tiempo.

Se aplicó un test de t para verificar diferencias entre los tratamientos utilizando el programa InfoStat versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011).

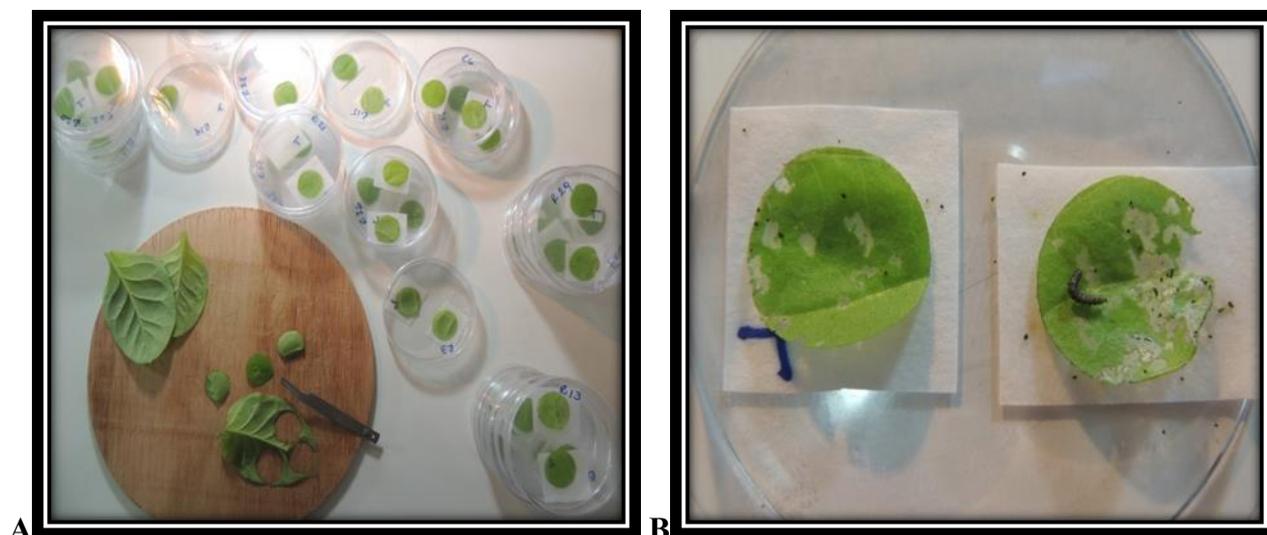


Figura IV-4: A- Ensayo de preferencia alimenticia con larvas de *Helicoverpa gelotopoeon*. B- A la izquierda se observa el disco tratado y a la derecha el disco control ofrecidos a la larva.

Bioensayo 2: Efecto de *B. bassiana* como endófito sobre la preferencia alimenticia de adultos de *D. speciosa*.

Se utilizaron adultos de *D. speciosa* para llevar a cabo un test de preferencia (choice test). La metodología llevada a cabo fue la misma que la realizada para las larvas de *H. gelotopoeon*. En este ensayo, a cada adulto se lo ubicó de manera individual en una caja de Petri plástica estéril y se le ofreció un disco de hoja de tabaco sin inocular y otro disco perteneciente a plantas de tabaco que presentaban como endófito a *B. bassiana* (ambas colocadas sobre papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril) (Figura IV-5). A las 24 h. de transcurrido el ensayo, se registró el área foliar consumida de cada disco mediante el programa Image J (Bailer 2006). Se realizaron 30 repeticiones. El experimento fue repetido tres veces en el tiempo.

Se realizó un test de t en busca de diferencias en el consumo mediante el programa InfoStat versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011).

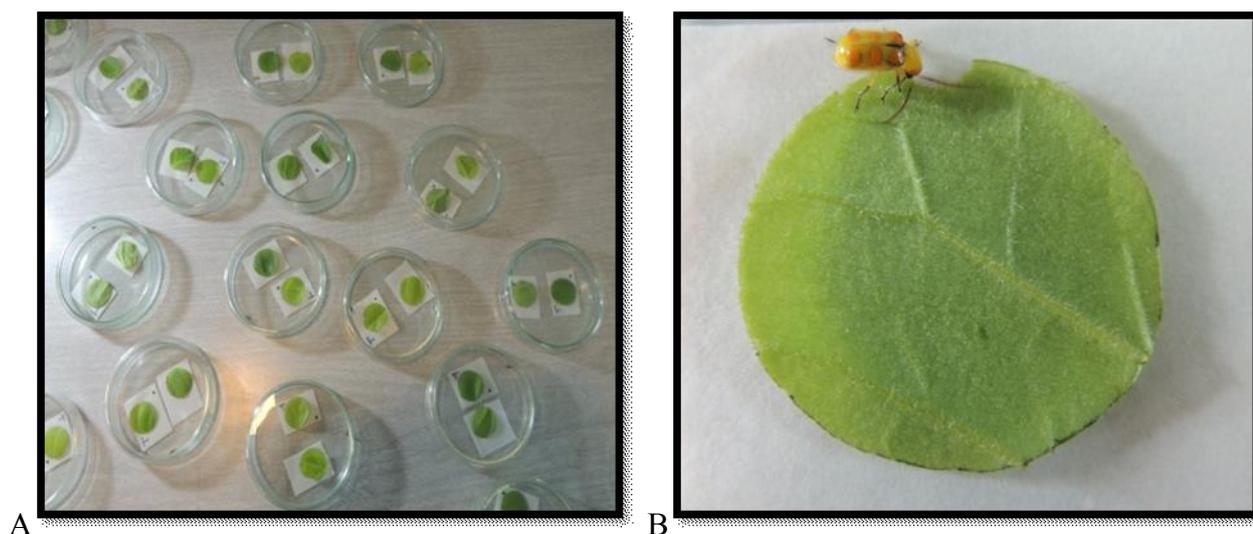


Figura IV-5: A- Ensayo de preferencia alimenticia realizado con adultos de *Diabrotica speciosa*. B- Adulto de *D. speciosa* alimentándose de un disco de hoja.

Bioensayo 3: Efecto de *B.bassiana* como endófito sobre parámetros biológicos de *H. gelotopoeon*.

Doscientos huevos de *H. gelotopoen* fueron colocados en cajas de Petri plásticas estéril. Luego de su eclosión, las larvas fueron alimentadas con hojas de tabaco con o sin *B. bassiana* como endófito (n=100 para cada tipo de hoja).

Las hojas de tabaco fueron renovadas diariamente hasta que las larvas alcanzaron el estadio de pupa, siendo éstas la única fuente de alimento que poseían. Para esto, regularmente se inocularon plantas de tabaco de 6 semanas de edad con *B. bassiana*. A fin de corroborar la presencia del endófito a las 96 h. se sembraron fragmentos empleando la metodología detallada en el Capítulo 3, aquellas plantas en las que se confirmó la presencia del endófito fueron utilizadas para alimentar a las larvas.

Las pupas fueron sexadas de acuerdo a Angulo et al. (2008) y fueron colocadas en parejas (un macho y una hembra) en contenedores plásticos de 1000 cm³ hasta la emergencia de los adultos. Estos últimos, fueron provistos de un algodón embebido en solución azucarada como fuente de alimento (Greene et al. 1976).

Las imágenes que ilustran el bioensayo se encuentran en la Figura IV-6.

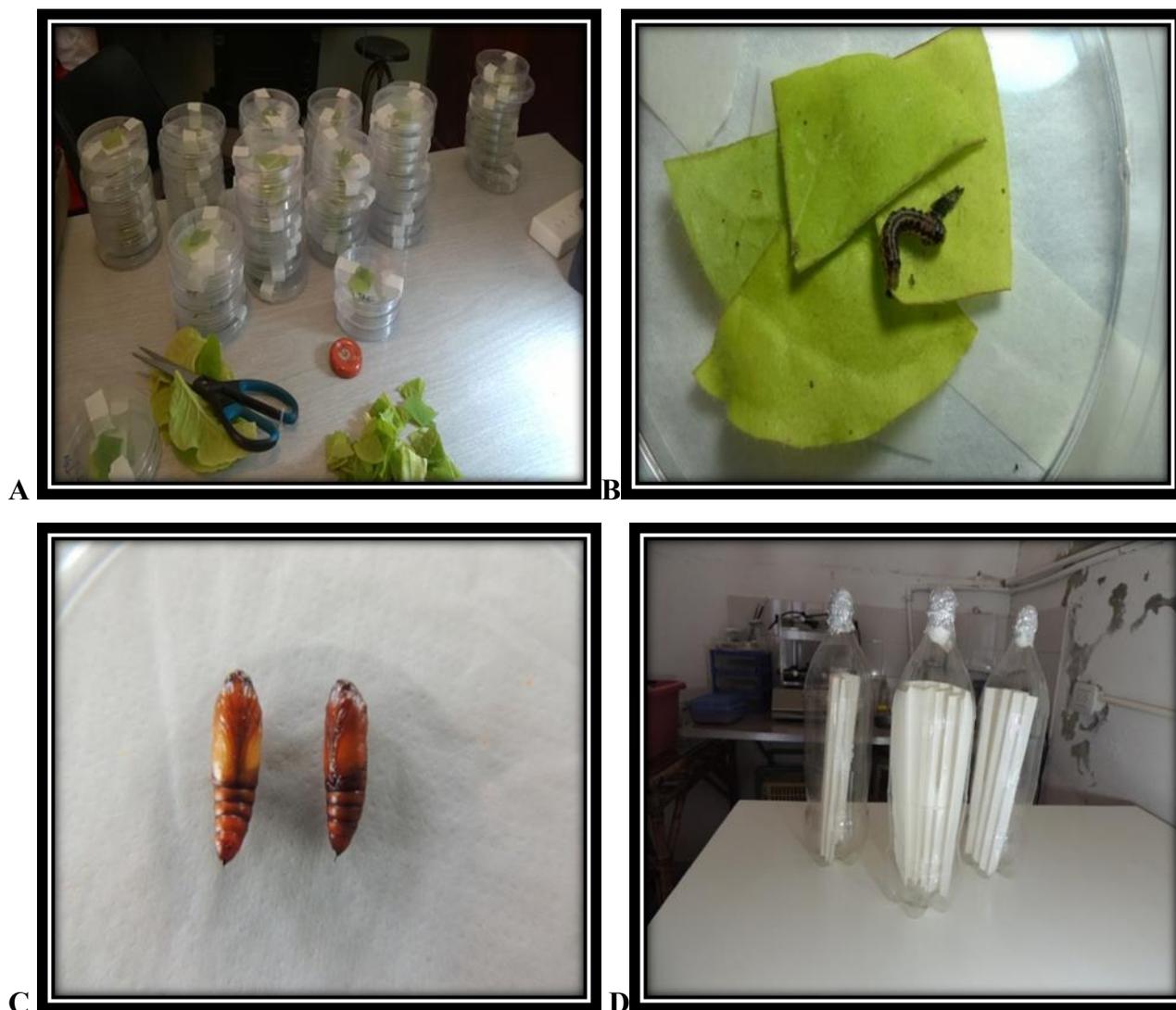


Figura IV-6: A-Bioensayo del ciclo de vida de *Helicoverpa gelotopoeon*, B- Larva alimentándose de hojas de tabaco, C- Pupas hembra y macho respectivamente y D- Jaulas de oviposición para los adultos.

Parámetros biológicos evaluados

Diariamente se observó el desarrollo de los individuos de *H. gelotopoeon*, registrándose el número de individuos (nx), días vividos, la mortalidad por edad (dx) y la supervivencia (lx) para cada uno de los estadios (huevos, L1-L5, pupa y adulto).

En el caso de los diferentes estadios larvales, se consideró que un individuo había mudado cuando se observaba la cápsula cefálica del estadio previo. Como sustrato para la oviposición, se les colocaron dentro del recipiente de plástico trozos de papel.

Los individuos muertos fueron colocados en cámaras húmedas (Powell 2007) (Figura IV-7) para promover el desarrollo de estructuras fúngicas y confirmar así la muerte por micosis.

Fertilidad y Fecundidad

Se registraron el número de días en que las hembras ovipusieron, el número de huevos puestos y el número de huevos eclosionados para determinar los períodos de oviposición, la fecundidad y la fertilidad respectivamente.

Los datos obtenidos en el bioensayo 3 fueron analizados utilizando el programa Age Stage, Two-Sex life table Analysis (Chi 2013).

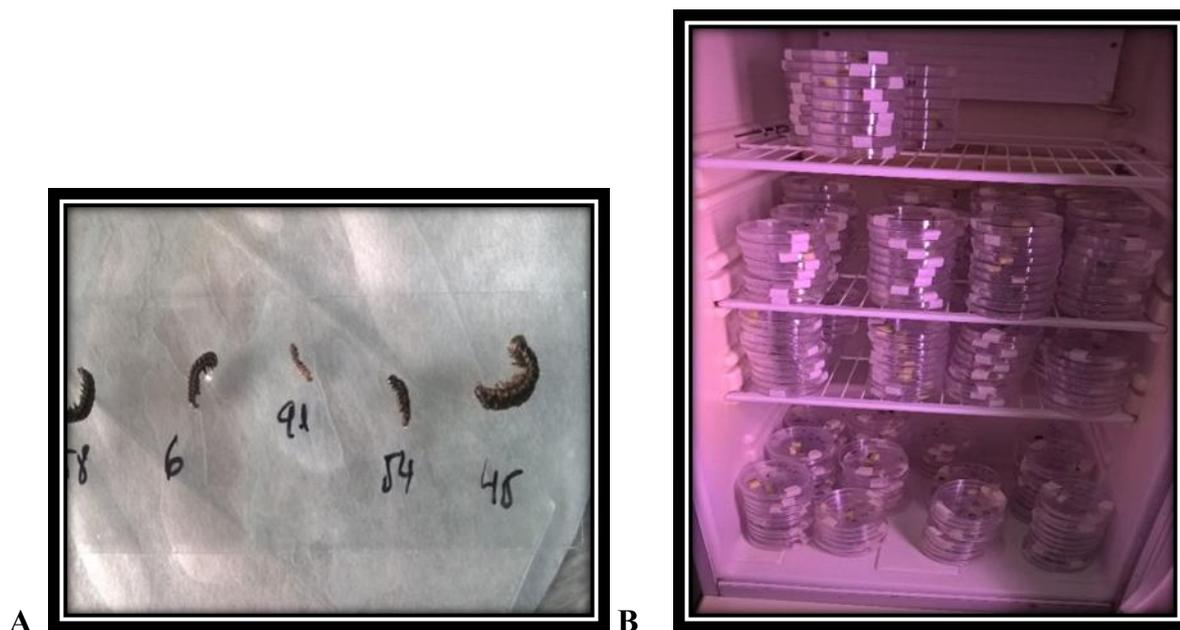


Figura IV-7: A-Cámara húmeda realizada con larvas de *Helicoverpa gelotopoeon*; B-Cámara de cría con las insectos durante el estudio de su ciclo de vida.

Resultados

Bioensayo 1: Efecto de *B. bassiana* como endófito sobre la preferencia alimenticia de *H. gelotopoeon*.

El área media consumida por las larvas del tercer estadio de *H. gelotopoeon* se muestra en la Figura IV-8. Las larvas control consumieron en promedio $1129,06 \pm 254,26 \text{ cm}^2$ de hojas de tabaco y aquellas larvas alimentadas con plantas que presentaban a *B. bassiana* como endófito consumieron en promedio $1201,43 \pm 226,36 \text{ cm}^2$. Si bien hubo un mayor consumo por parte de las larvas que se alimentaron con plantas control, estadísticamente esto no se vio reflejado ya que los

resultados del test de t indican que no existen diferencias significativas en la preferencia alimenticia por parte de las larvas de *H. gelotopoeon* ($t= 0.35$, $gl= 58$, $p=0.72$).

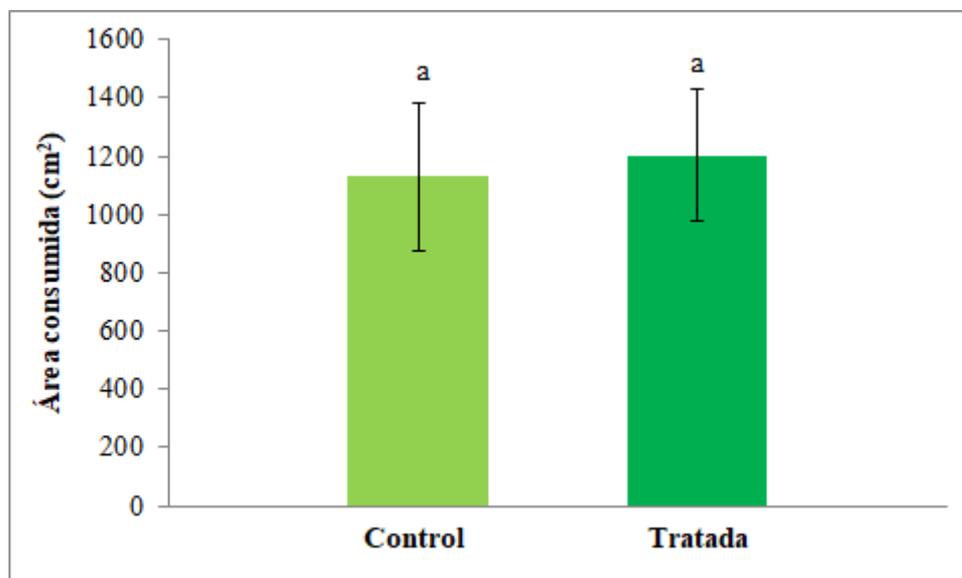


Figura IV-8: Área promedio consumida (cm²) por larvas del tercer estadio de *Helicoverpa gelotopoeon*. Las barras indican \pm EEM. Letras diferentes significan diferencias significativas de acuerdo Tukey ($p<0,05$).

Bioensayo 2: Efecto de *B. bassiana* como endófito sobre la preferencia alimenticia de adultos de *D. speciosa*.

El área media consumida por los adultos de *D. speciosa* se muestra en la Figura IV-9. Los insectos control consumieron en promedio $1996,08 \pm 282,2$ cm² de hojas de tabaco y aquellas alimentadas con plantas colonizadas con el hongo consumieron en promedio $2363,81 \pm 181,40$ cm². También se observa que si bien hubo un mayor consumo por parte de los ejemplares adultos de *D. speciosa*, de aquellas hojas de tabaco que provenían de plantas control, esta diferencia de consumo no fue estadísticamente significativa según los resultados arrojados por el test de t ($t= 1,1$; $gl= 50$, $p=0,28$).

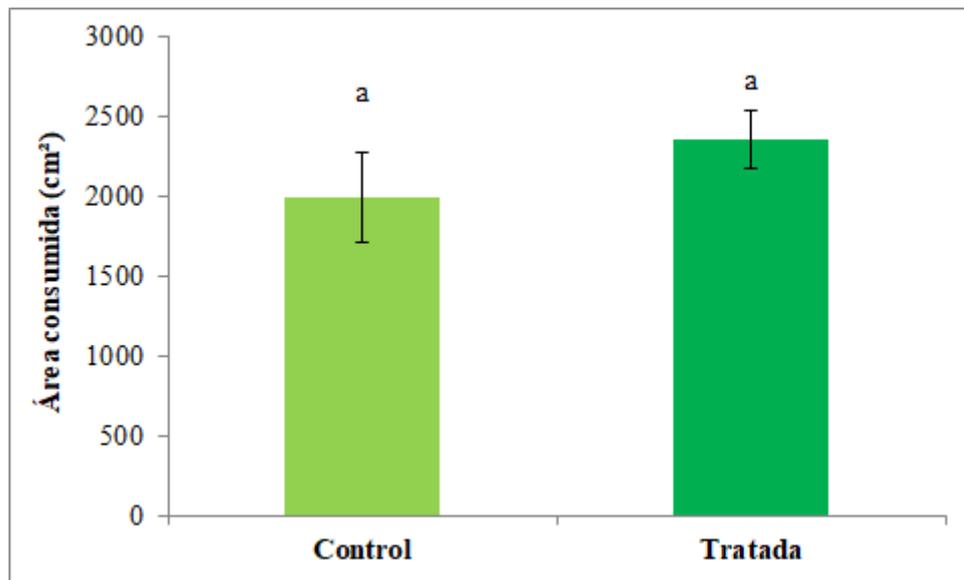


Figura IV-9: Área promedio consumida (cm²) por adultos de *Diabrotica speciosa*. Las barras indican \pm EEM. Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey ($p < 0,05$)

Bioensayo 3: Efecto de *B. bassiana* como endófito sobre parámetros biológicos *H. gelotopoeon*.

Los parámetros biológicos de *H. gelotopoeon* estudiados para aquellas larvas alimentadas con hojas controles y aquellas alimentadas exclusivamente con hojas de tabaco que presentaban a *B. bassiana* como endófito pueden apreciarse en la Tabla IV-1.

Tabla IV.1: Promedio de duración de cada estadio (días), número de individuos (nx), supervivencia (lx) y mortalidad (dx) de individuos de *Helicoverpa gelotopoeon* alimentados con plantas de tabaco inoculadas con *Beauveria bassiana* y no inoculadas (control).

Estadio	Control				Tratado				
	días	nx	lx	dx	días	nx	lx	dx	
Huevo	5,11± 2,04 a	100		1	05,3± 1,99 a	100		1	0
L1	3,62± 1,41 a		90	1	103,1± 1,29 b		89	0,9	11
L2	4,98± 2,03 a		88	1	24,26± 1,94 b		86	0,9	3
L3	4,7± 2,35 a		82	0,95	63,87± 2,04 b		81	0,85	5
L4	4,58± 2,34 a		81	0,9	13,88± 2,14 b		79	0,8	2
L5	4,08± 2,09 a		81	0,85	03,43± 2,04 b		76	0,75	3
Pupa	7,45± 4,09 a		78	0,8	37,33± 5,11 a		69	0,6	7
Adulto	3,84± 2,72 a		70	0,8	82,34± 2,29 b		58	0,6	11
Tiempo generacional (TG)	38,36± 1,2				3033,51± 1,54				42
Proporción de sexos F:M	1,12: 1				1,25: 1				

Los valores seguidos por distinta letra dentro de una misma fila muestran diferencias significativas de acuerdo al test de t $p < 0,05$.

El período de permanencia en estado de huevo y pupa no presentaron diferencias significativas en ambas cohortes ($t=0,66$; $gl=198$ y $t=0,18$; $gl=190$; $p=0,8549$ respectivamente). En cambio, todos los estadios larvales mostraron diferencias significativas entre los insectos alimentados con plantas control y aquellos alimentados con plantas tratadas (L1: $t=2,71$; $gl=198$; $p=0,0073$ L2: $t=2,56$; $gl=198$; $p=0,0113$ L3: $t=2,66$; $gl=198$; $p=0,0084$ L4: $t=2,2$; $gl=198$; $p=0,0289$ y L5: $t=2,22$; $gl=198$; $p=0,0277$). El estadio adulto también fue significativamente mayor para aquellos individuos alimentados con plantas control que para los alimentados con plantas tratadas ($t=4,21$; $gl=198$; $p < 0,0001$). El primer estadio larval fue el más susceptible en ambos tratamientos ($dx=10$; $dx=11$ respectivamente).

El tiempo generacional (TG) para los insectos provistos con plantas tratadas fue de $33,51 \pm 1,54$ días, para los insectos alimentados con plantas control fue de $38,36 \pm 1,2$ días.

Las curvas de supervivencia y fecundidad para los insectos alimentados con plantas control y plantas tratadas se muestran en la Figura IV-10. La curva de supervivencia disminuye más tempranamente para aquellos insectos alimentados con plantas tratadas que para los alimentados con plantas controles. El período reproductivo comenzó más tempranamente en insectos alimentados con plantas de tabaco que tenían a *B. bassiana* como endófito con respecto a aquellas

larvas alimentadas con plantas control (día 35 y 39 respectivamente) y tuvo una duración de 14 y 11 días respectivamente.

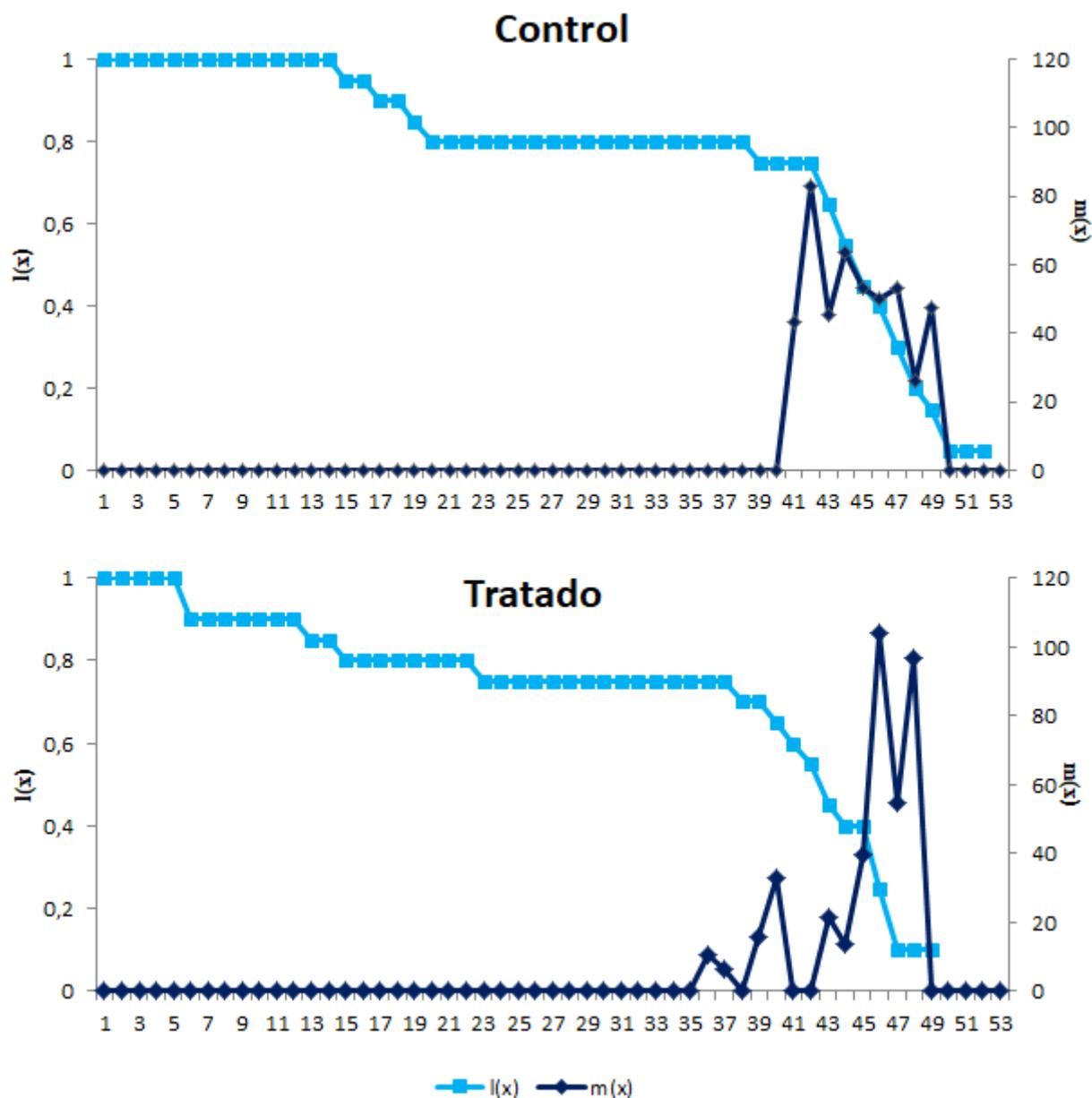


Figura IV-10: Curvas de supervivencia ($l(x)$) y fecundidad ($m(x)$) de *Helicoverpa gelotopoeon* en individuos alimentados con plantas control y con plantas colonizadas por *Beauveria bassiana*.

El período de oviposición para los insectos control fue de $3,83 \pm 1,04$ días y el número de huevos promedio puestos por las hembras fue de $506 \pm 86,47$. Por otro lado, el períodos de oviposición para las larvas alimentadas con plantas de tabaco que presentaban a *B. bassiana* como endófito fue del $2,56 \pm 0,51$ días y el número promedio de huevos puestos por hembra fue de

287,62±75,12. Se obtuvieron diferencias significativas en la fecundidad entre tratamientos ($t=2,78$; $gl=38$; $p=0,0085$).

Los valores porcentuales de fertilidad registrados fueron de 85,82%±16,46 y de 64,73%±20,05 para los individuos alimentados con plantas de tabaco control y plantas de tabaco tratadas con *B. bassiana* respectivamente (Figura IV-11). Se obtuvieron diferencias significativas en la fertilidad entre tratamientos ($t=3,16$; $gl=25$; $p=0,0037$).

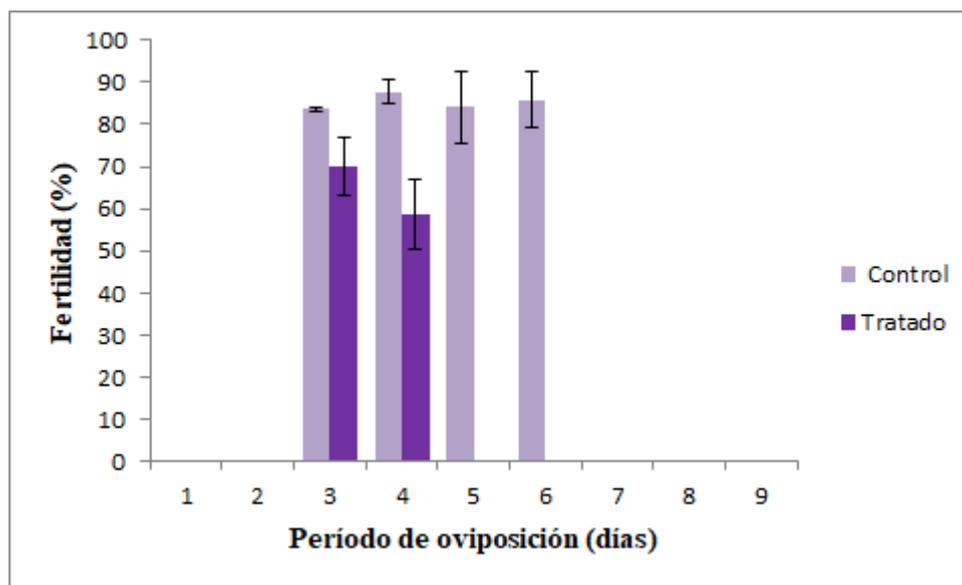


Figura IV-11: Valores porcentuales de fertilidad para individuos de *Helicoverpa gelotopoeon* alimentados con tabaco control y colonizados con *Beauveria bassiana*. Las barras indican ± EEM.

Los insectos muertos colocados en cámaras húmedas no desarrollaron micosis causada por *B. bassiana*.

Discusión

En este capítulo se presenta información novedosa sobre la interacción tritrófica entre el entomopatógeno *B. bassiana*, la plaga *H. gelotopoeon* y plantas de *N. tabacum* bajo condiciones de laboratorio. Además fueron estudiados los efectos del hongo entomopatógeno sobre el consumo foliar de adultos de la vaquita fitófaga *D. speciosa* y de las larvas de *H. gelotopoeon*.

La cepa *B. bassiana* LPSc 1215 (número de acceso GenBank MH050802) administrada como endófito no redujo la cantidad de tejido vegetal consumido por los adultos de *D. speciosa*. La misma cepa en carácter de endófito tampoco redujo la cantidad de material vegetal consumido por

las larvas de *H. gelotopoeon* pero si afectó su ciclo biológico, particularmente los estadios de larva y adulto acortando el desarrollo. Por otro lado la fertilidad de los huevos también se vio afectada ya que las hembras no sólo ovipusieron una cantidad significativa menor de huevos, sino que estos eclosionaron en un porcentaje menor.

Russo et al. (2015), Powell (2009) y Pelizza et al. 2017 reportaron signos de micosis en insectos muertos luego del consumo de plantas inoculadas con entomopatógenos. En contraste, en este estudio no se observó el desarrollo de micosis en los insectos colocados en cámara húmeda luego del consumo de hojas colonizadas con entomopatógenos fúngicos. Los mismos resultados fueron obtenidos por numerosos estudios (Barta et al. 2018, Cherry et al 2004, Akutse et al 2013, Resquín-Romero et al. 2016, Sanchez rodriguez, et al. 2018), esto podría indicar que los hongos entomopatógenos como endófitos ejercerían un efecto indirecto en la mortalidad. Esta hipótesis se fundamenta en que los herbívoros utilizados en los mencionados bioensayos, no tienen un contacto directo con el inóculo fúngico, en los tejidos colonizados y por eso el proceso de infección no podría darse como cuando existe un contacto directo conidio-cutícula. La mortalidad de los insectos alimentados con tejidos colonizados por entomopatógenos endófitos puede explicarse por la presencia en las plantas de distintos metabolitos secundarios producidos por los entomopatógenos que pueden provocar efectos insecticidas o antialimentarios (Cherry et al. 2004, Akutse et al. 2013; Resquín-Romero et al. 2016; Sánchez-Rodríguez et al. 2018). En este sentido, Resquin-Romero et al. (2016), hallaron trazas de destruxina A en larvas muertas alimentadas con *Metarhizium brunneum* como endófito.

Autores como Lartey et al. (1989) y Broza et al. (2001) concluyen mediante estudios realizados que los insectos plaga, no consumen o lo hacen en menor medida, sobre aquellas plantas que presentan a distintas especies de hongos entomopatógenos como endófitos. Sin embargo en el presente estudio este comportamiento no fue observado, ya que no se registraron diferencias significativas en el consumo de material vegetal por parte de las larvas del lepidóptero, ni en los adultos del coleóptero, alimentados con las plantas control y aquellas que presentaban a *B. bassiana* como endófito. Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron observados por Resquin-Romero et al. (2016), quienes evaluaron el peso de *Spodoptera littoralis* como parámetro, al ser alimentados con plantas colonizadas con *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp.. Asimismo, Leckie et al. (2008) y Lopez Castillo & Sword (2015) tampoco registraron efecto sobre el peso larval de *H. zea* alimentados con plantas tratadas y control. Por el contrario, el daño causado por *H. zea* y *Sesamia calamistis* se redujo cuando se ofreció a los insectos plantas colonizadas con *B. bassiana* (Powell et al. 2007, Cherry et al. 2004). Los mismos resultados fueron obtenidos por Mutune et al. (2016) quienes observaron que el comportamiento alimentario de larvas del díptero *Ophiomyia* sp fueron

negativamente afectadas por la alimentación con plantas tratadas de *Phaseolus vulgaris*. Lopez Castillo et al. (2014) y Martinuz et al. (2012) demostraron mediante ensayos de preferencia que *Aphis gossypii* se alimentó preferentemente de plantas no colonizadas.

Este ensayo demostró que el hongo entomopatógeno *B. bassiana* como endófito en plantas de tabaco, afecta negativamente la supervivencia, la fertilidad y la longevidad larval, de *H. gelotopoeon* mientras que en los adultos afecta negativamente el tiempo generacional, el período de oviposición, la fecundidad y la fertilidad. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cherry et al. (2004), Lopez & Sword (2015) y Mutune et al. (2016) quienes demostraron que plantas que presentaban a hongos entomopatógenos como endófitos provocaron efectos adversos sobre el crecimiento y desarrollo de los insectos estudiados.

Otras posibles explicaciones que se han esbozado para explicar la disminución en las tasas de crecimiento de los insectos debido a la colonización endofítica por hongos entomopatógenos, por ejemplo la inducción directa o indirecta de mecanismos de defensa desencadenados en las plantas por la presencia del endófito (Hartley & Gange 2009). Alteraciones en la duración del ciclo de vida y la fecundidad han sido también reportados Jaber & Vidal (2010). Ellos observaron que el hongo *A. strictum* como endófito en plantas de *Vicia faba* provocaba reducciones significativas en el crecimiento larval y la fecundidad de *H. armigera*, y atribuyeron estos efectos negativos a mecanismos indirectos desencadenados por la presencia del endófito en la planta cuando el fitófago se alimenta. Otros estudios también han demostrado efectos negativos sobre el fitness de insectos herbívoros debidos a la presencia de hongos endófitos en las plantas huésped (Crawford et al. 2010, Gurulingappa et al. 2011, Hernawati et al. 2011) pero en estos casos los efectos han sido atribuidos a metabolitos secundarios liberados por el hongo (Ball et al. 2006, Thakur et al. 2012).

Si bien estos resultados proveen información novedosa sobre las potencialidades de los hongos entomopatógenos como endófitos para el control de plagas, los mecanismos involucrados en la interacción entre *B. bassiana*, *H. gelotopoeon* y las plantas de tabaco quedan aún por ser dilucidados.

Conclusiones



Durante el desarrollo del trabajo de tesis se aislaron 1588 cepas fúngicas a partir de 2160 fragmentos que fueron clasificadas en 31 morfotaxa presentes naturalmente en raíces, tallos y hojas de *N. tabacum*. La mayor parte de los hongos aislados pertenecieron al phylum Ascomycota y sólo dos taxa correspondieron al Phylum Zygomycota. Los morfotaxa más relevantes por abundancia fueron *Alternaria botrytis*, *Fusarium graminearum*, *F. tabacinum*, *F. oxysporum*, *Aspergillus terreus*, *A. flavus*, *Absidia* sp. y dos especies de *Penicillium*.

La mayor diversidad de hongos endófitos fue observada en las hojas de las plantas de tabaco. A su vez, las comunidades presentes en cada uno de los órganos estudiados están bien definidas, siendo algunas asociaciones particulares de las hojas (*Emericella*, *Acremonium* sp. 1, *Acremonium* sp. 3, *F. graminearum*, *Fusarium* sp. 2, *F. solani*, *A. alternata*, *Cladosporium* sp., *A. botrytis* y Mycelia esterilia 4), otras de los tallos (*Penicillium* sp. 1, *Emericellopsis*, *F. oxysporum*, *Fusarium* sp. 1, *Alternaria* sp. 1, *Humicola grisea*, Mycelia esterilia 1 y Mycelia esterilia 2) y otras de las raíces (*A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp. 3, *Mucor* sp., *Absidia* sp., *Trichoderma viride* y *Nigrospora* sp).

No se registraron insectos infectados por hongos entomopatógenos a campo. Se aislaron 20 cepas de hongos entomopatógenos de suelos de cultivo de tabaco, de las cuales once correspondieron a la especie *B. bassiana*, ocho a *P. lilacinum* y una a *M. anisopliae*.

El análisis de diversidad génica utilizando marcadores ISSR generó 4 clusters para los once aislamientos de *B. bassiana* y 4 clusters para los ocho aislamientos de *P. lilacinum*.

La patogenicidad de los aislamientos de *B. bassiana* que mostraron frente a *H. gelotopoeon* se vio reflejada en los grupos establecidos molecularmente, ya que aquellas cepas más virulentas se agruparon en un mismo cluster y las menos en otros.

La patogenicidad de los aislamientos de *P. lilacinum* que mostraron frente a *D. speciosa* se vio reflejada en los grupos establecidos molecularmente, ya que aquellas cepas más virulentas se agruparon en un mismo cluster y las menos en otros.

La identidad de los aislamientos fue confirmada mediante análisis molecular como pertenecientes a las especies *B. bassiana* y *P. lilacinum*.

Todas las cepas de *B. bassiana* fueron capaces de colonizar endofíticamente las plantas de tabaco, excepto las cepas LPSc 1365, LPSc 1214 y LPSc 1364.

En los tres órganos estudiados, la cepa de *B. bassiana* LPSc 1215, aislada de suelo de cultivo de tabaco, fue la que presentó los mayores porcentajes de colonización

Todas las cepas de *P. lilacinum* estudiadas pudieron recuperarse de los distintos órganos de las plantas de tabaco inoculadas, excepto la cepa LPSc 1371 la cual no logró ser re-aislada en raíz.

La cepa LPSc 1366 de *M. anisopliae* logró colonizar endofíticamente las plantas de tabaco, y además se logró recuperar a los 28 días post-inoculación pero sólo de las raíces de las plantas. La cepa LPSc 907 de *M. anisopliae* no logró colonizar endofíticamente ninguno de los órganos de las plantas de tabaco inoculadas.

La técnica de aspersión foliar fue efectiva para establecer distintas especies de hongos entomopatógenos como endófitos en plantas de tabaco. Sin embargo esto varía según la capacidad endofítica de las cepas.

De todas las cepas de hongos entomopatógenos estudiadas la cepa de *B. bassiana* LPSc 1215 fue la que mayor capacidad endofítica mostró en hoja, tallo y raíz.

Las larvas de *H. gelotopoeon* y los adultos de *D. speciosa* no mostraron diferencias significativas estadísticamente con respecto al consumo de plantas que presentaban a *B. bassiana* como endófito cuando se las comparó con aquellas larvas que fueron alimentadas con plantas control.

El período de permanencia en estado de huevo y pupa de *H. gelotopoeon* no presentó diferencias significativas entre las cohortes alimentadas con plantas control y aquellas que presentaban a *B. bassiana* como endófito. En cambio, todos los estadios larvales y los adultos mostraron diferencias significativas entre los insectos alimentados con plantas control y aquellos alimentados con plantas tratadas.

La fecundidad, la fertilidad y el período de oviposición de las hembras de *H. gelotopoeon* fue significativamente menor en aquellas que fueron alimentadas con plantas que presentaban a *B. bassiana* como endófito, comparadas con las hembras alimentadas con plantas control.

Perspectivas futuras

Los hongos impactan profundamente en los ecosistemas globales.

*Ellos modifican nuestros hábitats y son esenciales
para que se cumplan las funciones en los ecosistemas.*

Blackwell et al. (2006)



Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral alientan a profundizar en el conocimiento de las interacciones entre las plantas de tabaco, los hongos entomopatógenos y su acción como endófitos en los insectos plaga que presenta el cultivo. Para ello se propone:

- Ampliar los estudios vinculados a la ecología de los hongos endófitos en el cultivo del tabaco, tanto de aquellos que naturalmente se encuentran en las plantas de tabaco como de aquellos inoculados artificialmente.

- Determinar la/las técnicas que permiten caracterizar de manera más representativa las comunidades de hongos endófitos.

- Determinar aquellos factores que potencialmente pueden desencadenar la patogenicidad de hongos endófitos que se encuentren naturalmente en la planta huésped.

- Realizar ensayos *in vitro* y a campo para estudiar la interacción entre los hongos entomopatógenos que actúan como endófitos y los agroquímicos, a fin de evaluar si existen efectos sinérgicos, antagonistas o neutros. Si las combinaciones resultan ser aditivas o sinérgicas profundizar entonces los estudios en relación al efecto sobre los insectos plaga.

- Evaluar los efectos de la cepa LPSc 1215 de *B. bassiana* frente a otros insectos, nematodos y también evaluar su potencial como controlador de patógenos del cultivo de tabaco.

- Determinar la actividad enzimática (proteolítica, quitinolítica y lipídica) de aquellos hongos entomopatógenos que mostraron una mayor capacidad entomocida y endofítica.

- Estudiar la producción de metabolitos secundarios de los hongos entomopatógenos que actúan como endófitos y evaluar sus efectos sobre las plantas de tabaco y los insectos plaga. Determinar si estos compuestos inducen mecanismos de defensa por parte de las plantas que afectan a los insectos o si lo hacen directamente.

- Determinar si las bandas amplificadas en el análisis de ISSR que justifican la agrupación de las cepas de *B. bassiana* LPSc 1215 y LPSc 1364, codifican algún gen vinculado a la virulencia de las cepas o si se encuentran cercanos a algún otro gen que determine la patogenicidad.

Referencias Bibliográficas



Akello, J., Dubois, T., Coyne, D., & Hillnhutter, C. 2007. *Beauveria bassiana* as an endophyte in tissue-cultured banana plants: a novel way to combat the banana weevil *Cosmopolites sordidus*. In III International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Recent Advances in Banana Crop Protection for Sustainable 828 (pp. 129-138).

Akello, J. & Sikora, R. 2012. Systemic acropedal influence of endophyte seed treatment on *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive fitness. *Biological Control*. 61: 215–221.

Akutse, K.S., Maniania, N.K., Fiaboe, K.K.M., Van Den Berg, J. & Ekesi, S. 2013. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Fungal Ecology* 6: 293–301.

Aljanabi, S.M. & Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692-4693.

Allegrucci, N., Velazquez, M. S., Russo, M. L., Pérez, M. E., & Scorsetti, A. C. 2017. Endophytic colonisation of tomato by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: the use of different inoculation techniques and their effects on the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Plant Protection Research* 57(4), 206.

Altre, J. A., & Vandenberg, J. D. 2001. Factors influencing the infectivity of isolates of *Paecilomyces fumosoroseus* against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78(1), 31-36.

Aly, A.H., Debbab, A., Kjer, J. & Proksch, P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity* 41(1):1–16.

Angulo, A.O., Olivares, T.S. & Weigert, G.T. 2008. Estados inmaduros de lepidópteros noctuidos de importancia agrícola y forestal en Chile y claves para su identificación (Lepidoptera: Noctuidae). 3rd ed. Concepción, Universidad de Concepción, 154p.

- Araújo, J.P. & Hughes, D.P. 2016. Diversity of entomopathogenic fungi: which groups conquered the insect body? *Advances in Genetics* 94, 1-39.
- Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kyllö, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(26), 15649-15654.
- Arnold, A. E., & Herre, E. A. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95(3), 388-398.
- Arnold, A.E. & Lutzoni, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88(3), 541-549.
- Avis J.C. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. Sinauer Associates, Sunderland.
- Ayala-Zermeño, M.A., Gallou, A., Berlanga-Padilla, A.M., Serna-Domínguez, M.G., Arredondo-Bernal, H.C., & Montesinos-Matías, R. 2015. Characterisation of entomopathogenic fungi used in the biological control programme of *Diaphorina citri* in Mexico. *Biocontrol Science and Technology* 25(10), 1192-1207.
- Bacon, C.W., Porter, J.K., Robbins, J.D. & Luttrell, E.S. 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 34(5), 576-581.
- Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S-H., Strem, M.D. & Melnick, R.L. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate dis 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany* 60(11):3279–3295.
- Bailer, W. 2006. Writing ImageJ plugins—a tutorial. Upper Austria University of Applied Sciences, Austria.
- Ball, O.J.P., Coudron, T.A., Tapper, B.A., Davies, E., Trently, D., Bush, L.P., ...& Popay, A.J. 2006. Importance of host plant species, *Neotyphodium* endophyte isolate, and alkaloids on feeding by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Journal of Economic Entomology* 99(4), 1462-1473.

- Bamisile, B.S., Dash, C.K., Akutse, K.S., Keppanan, R. & Wang, L. 2018. Fungal Endophytes: Beyond Herbivore Management. *Frontiers in microbiology* 9, 544.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathology Society: St Paul, 240pp.
- Barta, M. 2018. In planta bioassay on the effects of endophytic *Beauveria* strains against larvae of horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*). *Biological control* 121, 88-98.
- Bateman, R. 2004. Constraints and enabling technologies for mycopesticide development. *Outlooks on Pest Management* 15(2) 64.
- Batta, Y. A. 2013. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. *Crop protection* 44, 128-134.
- Behie, S.W., Jones, S.J., & Bidochka, M.J. 2015. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology* 13, 112-119.
- Berenbaum, M.R., & Eisner, T. 2008. Bugs' bugs. *Science* Vol. 322: 52-53.
- Berruezo, L.A., Cárdenas, G.E.M., Harries, E.D.M., Stenglein, S.A., Curti, R.N., Rodriguero, M.S., & Galván, M.Z. 2018. Characterization of *Fusarium* species associated with tobacco diseases in Northwestern Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 1-15.
- Bich, G.A., Castrillo, M.L., Silva, M.R., Díaz, G.V., Villalba, L.L., & Medvedeff, M.G. 2015. Hongos entomopatógenos en la provincia de Misiones: Revisión. *Revista de Ciencia y Tecnología* 23, 54-58.
- Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98(3), 426-438.
- Boomsma, J.J., Jensen, A.B., Meyling, N.V., & Eilenberg, J. 2014. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annual Review of Entomology* 59, 467-485.

Brem, D. & Leuchtman, A. 2001. *Epichloë* grass endophytes increase herbivore resistance in the woodland grass *Brachypodium sylvaticum*. *Oecologia* 126(4), 522-530.

Brownbridge, M., Reay, S.D., Nelson, T.L., & Glare, T.R. 2012. Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of radiata pine seed and seedlings. *Biological Control* 61(3), 194-200.

Broza, M., Pereira, R.M & Stimac, J.L. 2001. The nonsusceptibility of soilcollembola to insect pathogens and their potential as scavengers of microbial pesticides. *Pedobiology* 5: 523-534.

Brum, M.C.P.D., Araujo, W.L.D., Maki, C.S.n& Azevedo, J L.D. 2012. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. *Genetics and Molecular Research* 11(4), 4187-4197.

Butt, T.M. & Goettel, M.S. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes* 141-195.

Butt, T. M., Wang, C., Shah, F. A., & Hall, R. 2006. Degeneration of entomogenous fungi. In *An ecological and societal approach to biological control* (pp. 213-226). Springer, Dordrecht.

Butt, T.M., Coates, C. J., Dubovskiy, I. M., & Ratcliffe, N. A. 2016. Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. In *Advances in genetics* 94 pp. 307-364. Academic Press.

Cabrera Walsh, G. & Cabrera, N. 2004. Distribution and hosts of the pestiferous and other common diabroticites from Argentina and southern South America: a geographic and systematic view. *New Contributions to the Biology of Chrysomelidae* 333-350.

Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes: Guía de productos fitosanitarios. 2015. Tomo 1. CASAFE. Buenos Aires. Argentina.

Cámara del Tabaco de Jujuy. 2008. http://www.tabacojujuy.com.ar/produccion_nacional.htm

Cannon, P.F. 1996. Filamentous fungi. In: Hall, G.S. (Ed.), *Methods for the Examination of Organismal Diversity in Soils and Sediments*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 125–143.

Carroll, G.C. & Petrini, O. 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliae. *Mycologia*. 75, 53-63.

Cherry, A.J., Lomer, C.J., Djegui, D., Shulthess, F. 1999. Pathogen incidence and their potential as microbial control agents in IPM of maize stem borers in West Africa. *BioControl* 44, 301–327.

Cherry, A.J., Banito, A., Djegui, D. & Lomer, C. 2004. Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera:Noctuidae) in maize following seed dressing, topical application and stem injection with African isolates of *Beauveria bassiana*. *International Journal of Pest Management* 50(1): 67-73.

Chi H. 2013. TWSEX-MSChart: a computer program for the age-stage, two-sex life table analysis. Available from: <http://140.120.197.173/Ecology/Download/TwosexMSChart.zip>

Choi, Y.W., Hodgkiss, I.J. & Hyde, K.D. 2005. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*. 1; 55-66.

Clifton, E.H., Jaronski, S.T., Hodgson, E.W. & Gassmann, A.J. 2015. Abundance of soil-borne entomopathogenic fungi in organic and conventional fields in the Midwestern USA with an emphasis on the effect of herbicides and fungicides on fungal persistence. *PloS one* 10(7) e0133613.

Collado, J., Platas G., González, I. & Peláez, F. 1999 Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist* 14:525–532

Collado, J., Platas, G. & Peláez, F. 2000. Host specificity in fungal endophytic populations of *Quercus ilex* and *Quercus faginea* from central Spain. *Nova Hedwigia* 71(3/4), 421-430.

Colwell, R.K. 2013 EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9. User's Guide and application at < <http://purl.oclc.org/estimates>. Último acceso Marzo 2017.

Corradini, E., Cuesta, R., Morello, P., Segresso, R., & Gimenez, M. L. 2003. Programa de reconversión de áreas tabacaleras-UCA-. Caracterización del sector productor tabacalero en la República Argentina. Serie UCA: Documentos de investigación.

Corradini, E., Cuesta, R., Merello, P., Sgesso, R., Gimenez, M. L., Molfesa, S., & Musco, J. M. 2005. Caracterización del sector productor tabacalero en la República Argentina. Buenos Aires: Universidad Católica Argentina.

Cory, J.S. & Ericsson, J.D. 2009. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. In *The Ecology of Fungal Entomopathogens* (pp. 75-88). Springer, Dordrecht.

Crawford, K.M., Land, J.M. & Rudgers, J.A. 2010. Fungal endophytes of native grasses decrease insect herbivore preference and performance. *Oecologia* 164(2): 431-444.

Currie, A.F., Wearn, J., Hodgson, S., Wendt, H., Broughton, S., & Jin, L. 2014. Foliar fungal endophytes in herbaceous plants: a marriage of convenience? In: Verma V., Gange A. (eds) *Advances in Endophytic Research*. Springer, New Delhi, pp. 61-81.

Dalleau-Clouet, C., Gauthier, N., Risterucci, A. M., Bon, M. C., & Fargues, J. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Molecular Ecology Notes* 5(3), 496-498.

Delaye, L., García-Guzmán, G. & Heil, M. 2013. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens—are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? *Fungal Diversity* 60(1), 125-135.

Delgado, H.A. & Fedre, D. 2003. Factores que afectan la abundancia poblacional de *Helicoverpa (heliiothis) virescens* en tabaco en el noroeste argentino. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* No. 70 p.36-45.

De Faria, M.R. & Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43(3), 237-256.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., & Robledo, Y.C. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar> 8, 195-199.

Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.H. 2003. Compendium of soil fungi. Academic Press, New York, NY, USA.

Dubovskiy, I.M., Whitten, M.M., Yaroslavtseva, O.N., Greig, C., Kryukov, V Y., Grizanova, E.V. & Butt, T.M. 2013. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? PloS one 8(4) e60248.

Ekesi, S., Maniania, N.K., & Ampong-Nyarko, K. 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. Biocontrol Science and Technology 9(2) 177-185.

Enkerli, J., Kölliker, R., Keller, S., & Widmer, F. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Molecular Ecology Notes 5(2), 384-386.

Enkerli, J., & Widmer, F. 2010. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. BioControl 55(1), 17-37.

Espinosa-Garcia, F.J. & Langenheim, J.H. 1990. The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population - diversity and spatial patterns. New Phytologist U6, 89-97.

Fisher, P.J., Petrini, O. & Scott, H.M.L. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L). New Phytologist 122:299–305.

Fröhlich, J., Hyde, K.D. & Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. Mycological Research 104(10), 1202-1212.

Fürnkranz, M., Lukesch, B., Müller, H., Huss, H., Grube, M. & Berg, G. 2012. Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. Microbial Ecology 63(2), 418-428.

Gange, A.C., Eschen, R., Wearn, J.A., Thawer, A. & Sutton, B.C. 2012. Differential effects of foliar endophytic fungi on insect herbivores attacking a herbaceous plant. Oecologia 168(4), 1023-1031.

- Ganley, R.J., & Newcombe, G. 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research* 110(3), 318-27.
- García E. J., Posadas, J. B., Peticari, A. & Lecuona, R. E. 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in Biological Research* 5(1), 22-27.
- Garrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Amarilla, S.P., Ríos-Moreno, A., Carrasco, L., & Quesada-Moraga, E. 2017. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Pest Science* 90(1), 319-330.
- Gathage, J.W., Lagat, Z.O., Fiaboe, K.K.M., Akutse, K.S., Ekesi, S. & Maniania, N.K. 2016. Prospects of fungal endophytes in the control of *Liriomyza* leafminer flies in common bean *Phaseolus vulgaris* under field conditions. *Biocontrol* 61(6), 741-753.
- Gibson, D.M., Donzelli, B.G., Krasnoff, S.B., & Keyhani, N.O. 2014. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. *Natural Product Reports* 31(10), 1287-1305.
- Giordano, L., Gonthier, P., Varese, G.C., Miserere, L., & Nicolotti, G. 2009. Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. *Fungal Diversity* 38(69), e83.
- Glienke-Blanco, C., Aguilar-Vildoso, C.I., Vieira, M.L.C., Barroso, P.A.V. & Azevedo, J.L. 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genetics and Molecular Biology* 25(2), 251-255.
- Goble, T., Dames, J., Hill, P. & Moore, S. 2010. The effects of farming system, habitat type and bait type on the isolation of entomopathogenic fungi from citrus soils in the Eastern Cape Province, South Africa. *BioControl* 55, 399–412.
- Goettel, M. S., & Inglis, G. D. 1997. Fungi: hyphomycetes. In *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 213-249). Academic Press.

- Gómez-Vidal, S., Lopez-Llorca, L.V., Jansson, H.B., & Salinas, J. 2006. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron* 37(7), 624-632.
- González-Rozada, M. 2006. Economía del control del tabaco en los países del Mercosur y Estados Asociados: Argentina: 1996-2004. Washington, D.C.: OPS. ISBN 92 75 32625 8.
- Gonzalez, M., K. S. Miglioranza, J. E. Aizpun, F. L. Isla, and A. Peña. 2010. Assessing pesticide leaching and desorption in soils with different agricultural activities from Argentina (Pampa and Patagonia). *Chemosphere* 81:351–358.
- Greene, G.L., Leppla, N.C. & Dickerson W.A. 1976. Velvet bean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69(4): 487-488.
- Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological control* 95, 40-48.
- Groth, J.V. & Roelfs, A.P. 1987. The concept and measurement of phenotypic diversity in *Puccinia graminis* on wheat. *Phytopathology* 77(10), 1395-1399.
- Guo, L.D., Hyde, K.D. & Liew, E.C.Y. 2001. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20, 1–13.
- Guo, L.D., Huang, G.R. & Wang, Y. 2008. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulae formis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(8) 997-1003.
- Gurulingappa, P., Sword, G.A., Murdoch, G. & McGee, P.A. 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological control* 55(1), 34-41.

- Gurulingappa, P., McGee, P.A. & Sword, G. 2011. Endophytic *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* reduce the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following contact with conidia and secondary metabolites. *Crop Protection* 30(3): 349-353.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* 41(41), 95-98. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Halmschlager, E., Butin, H. & Donaubaer, E. 1993. Endophytic fungi in leaves and twigs of *Quercus petraea*. *European Journal of Forest Pathology* 23(1), 51-63.
- Hammer, Ř., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis–*Palaeontol. Electron.* 4: 9 pp. Último acceso Marzo 2017.
- Hartley, S.E. & Gange, A.C. 2009. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual Review of Entomology* 54: 323-342.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological research* 95(6), 641-655.
- Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1• 5 million species estimate revisited. *Mycological research* 105(12), 1422-1432.
- Hernawati, H., Wiyono, S. & Santoso, S. 2011. Leaf endophytic fungi of chili (*Capsicum annum*) and their role in the protection against *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 12(4) 187-191.
- Herrero Asensio, N.H., Márquez, S.S., & Zabalgoeazcoa, I. 2013. Mycovirus effect on the endophytic establishment of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* in tomato and bean plants. *BioControl* 58(2), 225-232.
- Herrero, M.I., Fogliata, S.V., Vera, A., Casmuz, A., Gómez, D.S., Castagnaro, A.P. & Murúa, M.G. 2018. Biological characterization and mating compatibility of *Helicoverpa gelotopoeon* (D.)

(Lepidoptera: Noctuidae) populations from different regions in Argentina. *Bulletin of Entomological Research* 108(1): 108-115.

Hesketh, H., Roy, H.E., Eilenberg, J., Pell, J.K., & Hails, R.S. 2010. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. *BioControl* 55(1), 55-73.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., ...& Lumbsch, H.T. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111(5), 509-547.

Holder, D.J., & Keyhani, N.O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9), 5260-5266.

Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H. & Sun, M. 2008. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33: 61-75.

Humber, R.A. 1997. Fungi: preservation of cultures. In *Manual of Techniques in Insect Pathology* (pp. 269-279).

Humber, R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)* (pp. 151-187).

Hyde, K.D. & Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33(163), e173.

Inglis, G.D., Enkerli, J. & Goettel, M.S. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)* (pp. 189-253).

Jaber, L.R. 2018. Seed inoculation with endophytic fungal entomopathogens promotes plant growth and reduces crown and root rot (CRR) caused by *Fusarium culmorum* in wheat. *Planta* 1-11.

Jaber, L.R. & Araj, S.E. 2018. Interactions among endophytic fungal entomopathogens (Ascomycota: Hypocreales), the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae),

and the aphid endoparasitoid *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 116, 53-61.

Jaber, L.R. & Vidal, S. 2010. Fungal endophyte negative effects on herbivory are enhanced on intact plants and maintained in a subsequent generation. *Ecological Entomology* 35(1): 25-36.

Jaber, L.R., Araj, S.E., & Qasem, J.R. 2018. Compatibility of endophytic fungal entomopathogens with plant extracts for the management of sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae). *Biological Control*, 117, 164-171.

Jaber, L.R. & Ownley, B.H. 2017. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>

Jabbour, R. & Barbercheck, M.E. 2009. Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. *Biological Control* 51, 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.08.004>.

Jaronski, S.T. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl* 55(1), 159-185.

Jin, H, Cheng, C. & Xu, Q. 2017. Effects of endophytic fungi on tobacco growth and heavy metal content in leaves. *Mycosystema* 36(2), 186-192.

Jin, H.Q., Liu, H.B., Xie, Y.Y., Zhang, Y.G., Xu, Q.Q., Mao, L.J., ...& Zhang, C.L. 2018. Effect of the dark septate endophytic fungus *Acrocalymma vagum* on heavy metal content in tobacco leaves. *Symbiosis* 74(2), 89-95.

Kaur, T., Singh, B., Kaur, A., & Kaur, S. 2015. Endophyte-mediated interactions between cauliflower, the herbivore *Spodoptera litura*, and the ectoparasitoid *Bracon hebetor*. *Oecologia* 179(2), 487-494.

Kim, J. J. & Kim, K. C. 2008. Selection of a highly virulent isolate of *Lecanicillium attenuatum* against cotton aphid. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 11(1), 1-4.

Kleespies, R., Bathon, H. & Zimmermann, G. 1989. Untersuchungen zum natürlichen Vorkommen von entomopathogenen Pilzen und Nematoden in verschiedenen Böden in der Umgebung von Darmstadt. *Gesunde Pflanzen* 41(10), 350-355.

Klingen, I., Eilenberg, J. & Meadow, R. 2002. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 91(1-3), 191-198.

Klinger, E. G., James, R. R., Youssef, N. N., & Welker, D. L. 2013. A multi-gene phylogeny provides additional insight into the relationships between several *Ascosphaera* species. *Journal of invertebrate pathology* 112(1), 41-48.

Kobayasi, Y. & Shimizu, D. 1977. Some species of *Cordyceps* and its allies on spiders. *Kew Bulletin* 557-566.

Kumar, D.S.S. & Hyde, K.D. 2004. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* 17: 69-90.

Kumaresan, V. & Suryanarayanan, T.S. 2001. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycological Research* 105(11), 1388-1391.

Lacap, D.C., Hyde, K.D. & Liew, E.C.Y. 2003. An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity* 12, 53-66.

Lacava, P.T. & Azevedo, J.L. 2014. Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. pp. 231-256. In "Advances in Endophytic Research" (Verma, V.C.& Gange, A.C. eds.). Springer Science & Business Media. Springer, New Delhi, 454 pp.

Lacey, L.A. & Neven, L.G. 2006. The potential of the fungus, *Muscodor albus*, as a microbial control agent of potato tuber moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in stored potatoes. *Journal of Invertebrate Pathology* 91(3), 195-198.

Landa, B.B., López-Díaz, C., Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Muñoz-Ledesma, F.J., Ortiz-Urquiza, A. & Quesada-Moraga, E. 2013. In-planta detection and monitorization of

endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology* 114(2), 128-138.

Laumann, R.A., Ribeiro, P.H., Ramos, N., Pires, C.S., Schmidt, F.G.V., Borges, M., ...& Sujii, E.R. 2003. Ritmos diários de atividades comportamentais de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) relacionados à temperatura. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).

Lartey, R.T., Curl, E.A., Peterson, C.M., & Harper, J.D. 1989. Mycophagous Grazing and Food Preference of *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) and *Onychiurus encarpatus* (Collembola: Onychiuridae). *Environmental Entomology* 18, 334-337

Leckie, B.M. 2002. Effects of *Beauveria bassiana* mycelia and metabolites incorporated into synthetic diet and fed to larval *Helicoverpa zea*, and detection of endophytic *Beauveria bassiana* in tomato plants using PCR and ITS. M.S. thesis, Department of Entomology, The University of Tennessee.

Leckie, B. M., Ownley, B. H., Pereira, R. M., Klingeman, W. E., Jones, C. J., & Gwinn, K. D. 2008. Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 18(7), 697-710.

Lecuona, R. E. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Ed. Buenos Aires, Argentina: Talleres gráficos Mariano Mas.

Ledesma, F.M. & Drenaje, M.S.E.R.Y. 2012. Evaluación del efecto de distintos regímenes de riego como estrategia de riego deficitario controlado en tabaco (*Nicotiana tabacum* L). Tesis Doctoral, Tesis de Magister en Riego y Drenaje. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias (Mendoza, Argentina).

Leger, R.S., Durrands, P.K., Charnley, A.K. & Cooper, R.M. 1988. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52(2), 285-293.

- Leger, R.J.S., Butt, T.M., Goettel, M.S., Staples, R.C. & Roberts, D.W. 1989. Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13(3), 274-288.
- Leger, R.J.S., Wang, C. & Fang, W. 2011. New perspectives on insect pathogens. *Fungal Biology Reviews* 25(2), 84-88.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2006. *Fusarium* laboratory workshops—A recent history. *Mycotoxin research* 22(2), 73-74.
- Liu, Y., Shen, D., Zhou, F., Wang, G. & An, C. 2014. Identification of immunity-related genes in *Ostrinia furnacalis* against entomopathogenic fungi by RNA-seq analysis. *PLoS One* 9(1), e86436.
- Lopez Castillo, D, Zhu-Salzman, K., Ek-Ramos, M.J. & Sword, G.A. 2014. The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. *PloS one* 9(8): e103891.
- Lopez Castillo, D. & Sword, G.A. 2015. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control* 89, 53-60.
- Martinuz, A., Schouten, A., Menjivar, R.D., Sikora, R.A. 2012. Effectiveness of systemic resistance toward *Aphis gossypii* (Aphididae) as induced by combined applications of the endophytes *Fusarium oxysporum* Fo162 and *Rhizobium etli* G12. *Biological Control* 62, 206–212.
- Márquez, S.S., Bills, G.F., Acuña, L.D. & Zabalgoceazcoa, I. 2010. Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. *Fungal Diversity* 41(1), 115-123.
- Massalin-Particulares. 2011. Manual de buenas practicas agrícolas para el cultivo del Tabaco Virginia, Jujuy-Salta.

Mastretta, C., Taghavi, S., Van Der Lelie, D., Mengoni, A., Galardi, F., Gonnelli, C. Vangronsveld, J., 2009. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *International Journal of Phytoremediation*. 11(3), 251-267.

Mauck, K.E. & Shapiro, L.R. 2018. Chemically-mediated Interactions among Cucurbits, Insects and Microbes. In *Chemical Ecology of Insects* pp. 55-90. CRC Press.

McGee, P.A. 2002. Reduced growth and deterrence from feeding of the insect pest *Helicoverpa armigera* associated with fungal endophytes from cotton. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 42(7), 995-999.

Mercado Cárdenas, G; Gimenez Monge J.L. & Ortega A.E. 2013. Manual de reconocimiento de plagas y enfermedades bióticas y abióticas en Tabaco. Primer Edición. Editorial: INTA Salta. 188pp.

Meyling, N.V. & Eilenberg, J. 2006. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycological research* 110(2), 188-195.

Meyling, N.V., Lubeck, M., Buckley, E.P., Eilenberg, J. & Rehner, S.A. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology* 18, 1282–1293.

Meyling, N.V., Thorup-Kristensen, K. & Eilenberg, J. 2011. Below-and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. *Biological Control* 59(2), 180-186.

Milanez, J.M. 1997. Ciclo biológico da vaquinha, praga do milho na região Sul do país. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, 10(1), 9-11.

Miles, L. A., Lopera, C. A., González, S., de García, M. C., Franco, A. E., & Restrepo, S. 2012. Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. *BioControl* 57(5), 697-710.

Miller, J.H. 1940. The genus *Myriangium* in North America. *Mycologia* 32(5), 587-600.

Molnar, I., Gibson, D.M., & Krasnoff, S.B. 2010. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. *Natural product reports* 27(9), 1241-1275.

Muller, C.B. & Krauss, J. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* 8(4):450–456.

Mussi, J. 2018. La problemática de los agroquímicos y sus envases, y su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente <http://www.ambiente.gov.ar>

Mutune, B., Ekesi, S., Niassy, S., Matiru, V., Bii, C. & Maniania, N.K. 2016. Fungal endophytes as promising tools for the management of bean stem maggot *Ophiomyia phaseoli* on beans *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Pest Science* 89(4): 993-1001.

Mwamburi, L.A., Laing, M.D. & Miller, R.M. 2015. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(1), 67-74.

Nagamani, A., Kunwar, I. K. & Manoharachary, C. 2006. *Handbook of soil fungi*. 1ed. I.K International Pvt. Ltd., New Delhi, 436 pp.

Napal, G.N.D., Carpinella, M.C. & Palacios, S.M. 2009. Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound. *Bioresource Technology* 100(14): 3669-3673.

Nussenbaum, A.L. & Lecuona, R.E. 2012. Selection of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato isolates as microbial control agents against the boll weevil (*Anthonomus grandis*) in Argentina. *Journal of invertebrate pathology* 110(1), 1-7.

Organización Mundial de la Salud (OMS) <http://www.who.int/es>.

Ormond, E.L., Thomas, A.P.M., Pugh, P.J.A., Pell, J.K & Roy, H.E. 2010. A fungal pathogen in time and space. the population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest. *FEMS Microbiology Ecology* 74, 146–154.

- Ortiz Urquiza, A., & Keyhani, N. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4(3), 357-374.
- Oulevey, C., Widmer, F., Kölliker, R., & Enkerli, J. 2009. An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. *Mycological research* 113(9), 1016-1024.
- Ownley, B.H., Pereira, R.M., Klingeman, W.E., Quigley, N.B. & Leckie, B.M. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. *Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost, India*, 255-269.
- Paez, S.L.A. 2018. Uso de agrotóxicos en el cultivo del tabaco, su impacto socio-ambiental en la zona centro de la provincia de Misiones, Argentina. Disponible en: <http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal15/Geografiasocioeconomica/Geografiaagricola/42.pdf>
- Pamphile, J.A. & Azevedo, J.L. 2002. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18:391–396.
- Parsa, S., Ortiz, V. & Vega, F.E. 2013. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *Journal of visualized experiments: JoVE* (74).
- Patana, R. 1977. Rearing selected western cotton insects in the laboratory. *ARS-W*.
- Pecchioni, M.T.D. 1988. Crianza de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) bajo condiciones de laboratorio. *Revista Peruana de Entomología*, Lima 31, 86-90.
- Pedrini, N., Crespo, R., & Juárez, M. P. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146(1-2), 124-137.

- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Zhang, S., & Keyhani, N. O. 2013. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in microbiology* 4, 24.
- Pelizza, S.A., Cabello, M.N. & Lange, C.E. 2010. Nuevos registros de hongos entomopatógenos en acridios (Orthoptera: Acridoidea) de la República Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 69(3-4), 287-291
- Pelizza, S.A., Eliades, L.A., Scorsetti, A.C., Cabello, M.N. & Lange, C.E. 2012a. Entomopathogenic fungi from Argentina for the control of *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae) nymphs: fungal pathogenicity and enzyme activity. *Biocontrol Science and Technology* 22(10), 1119-1129.
- Pelizza, S.A., Eliades, L.A., Saparrat, M.C.N., Cabello, M.N., Scorsetti, A.C. & Lange, C.E. 2012b. Screening of Argentine native fungal strains for biocontrol of the grasshopper *Tropidacris collaris*: relationship between fungal pathogenicity and chitinolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(4), 1359-1366.
- Pelizza, S. A., Mariottini, Y., Russo, L. M., Vianna, M. F., Scorsetti, A. C., & Lange, C. E. 2017. *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) introduced as an endophyte in corn plants and its effects on consumption, reproductive capacity, and food preference of *Dichroplus maculipennis* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae). *Journal of Insect Science* 17(2), 53.
- Pérez Consuegra, N. 2010. Alternativas al control químico de plagas. *Revista Virtual REDESMA4* (45).
- Petch, T. 1921. Studies in entomogenous fungi: II. The genera *Hypocrella* and *Aschersonia*. *Annals of the Royal Botanic Gardens, Peradeniya* 7, 169-279.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves*. Springer, New York, NY. (pp. 179-197).

- Petrini, O. & Fisher, P.J. 1987. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. Transactions of the British Mycological Society 91(2), 233-238.
- Pilz, C., Wegensteiner, R. & Keller, S. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for the control of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. Journal of Applied Entomology 131(6), 426-431.7
- Pimentel, I.C., Glienke-Blanco, C., Gabardo, J., Stuart, R.M. & Azevedo, J.L. 2006. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. Brazilian archives of Biology and Technology 49(5), 705-711.
- Pinto, L.S.R.C., Azevedo, J.L., Pereira, J.O., Vieira, M.L.C. & Labate, C.A. 2000. Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. The New Phytologist 147(3), 609-615.
- Poole, R.W. 1974. An Introduction to Quantitative Ecology. McGraw-Hill, New York.
- Posada, F. & Vega, F.E. 2005. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). Mycologia 97(6), 1195-1200.
- Posada, F. & Vega, F.E. 2006. Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Mycoscience 47(5), 284-289.
- Posada, F., Aime, M.C., Peterson, S.W., Rehner, S.A. & Vega, F.E. 2007. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Mycological Research 111, 748–757.
- Posadas, J.B., Comerio, R.M., Mini, J.I., Nussenbaum, A.L. & Lecuona, R.E. 2012. A novel iodine-free selective medium based on the use of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) to isolate *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* sensu lato and *Paecilomyces lilacinus* from soil. Mycologia 104(4), 974-980.

Powell, W.A., Klingeman, W.E., Ownley, B.H., Gwinn, K.D., Dee, M. & Flanagan, P.C. 2007. Endophytic *Beauveria bassiana* in tomatoes yields mycosis in tomato fruitworm larvae. HortScience 42(4), 933-933.

Powell, W.A., Klingeman, W.E., Ownley, B.H. & Gwinn, K. 2009. Evidence of Endophytic *Beauveria bassiana* in Seed-treated Tomato Plants Acting as a Systemic Entomopathogen to Larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Entomological Science 44(4), 391-396.

Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S. & De la Torre, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia 31(12), 856-860.

Qayyum, M. A., Wakil, W., Arif, M. J., Sahi, S. T., & Dunlap, C. A. 2015. Infection of *Helicoverpa armigera* by endophytic *Beauveria bassiana* colonizing tomato plants. Biological Control 90, 200-207.

Quesada-Moraga, E., Landa, B.B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Díaz, R.M., & Santiago-Alvarez, C. 2006. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. Mycopathologia 161(5), 323-329.

Quesada Moraga, E., Muñoz-Ledesma, J. & Santiago-Álvarez, C. 2009. Systemic Protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Environmental Entomology 38: 723–730.

Quin Duan, Y., He, S.T., Li, Q.Q., Wang, M.F., Wang, W.Y., Zhe, W., ... & Li, W.J. 2013. *Lysinibacillus tabacifolii* sp. nov., a novel endophytic bacterium isolated from *Nicotiana tabacum* leaves. Journal of Microbiology 51(3), 289-294.

Ramos, Y., Portal, O., Lysøe, E., Meyling, N.V. & Klingen, I. 2017. Diversity and abundance of *Beauveria bassiana* in soils, stink bugs and plant tissues of common bean from organic and conventional fields. Journal of Invertebrate Pathology doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.10.003>

Redecker, D., Kodner, R. & Graham, L.E. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. Science 289(5486):1920–1921.

Resquín-Romero, G., Garrido-Jurado, I., Delso, C., Ríos-Moreno, A. & Quesada-Moraga, E. 2016. Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 136: 23-31.

Rehner S.A. & Buckley E.P. 2003 Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Molecular Ecology Notes* 3:409–411.

Rehner, S. A. & Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97(1), 84-98.

Roberts, D.W. & Humber, R.A. 1981. Entomogenous fungi. *Biology of Conidial Fungi* 2(201), e236.

Rocha, A.C.S., Garcia, D., Uetanabaro, A.P.T., Carneiro, R.T.O., Araujo, I.S. & Mattos, C.R.R. 2011. Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Diversity* 47(1):75–84.

Rodriguez, R.J., White, J.F., Arnold, A.E. & Redman, A.R.A. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182(2), 314-330.

Rodriguez, R. & Redman, R. 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 59(5):1109–1114.

Rondot, Y. & Reineke, A. 2018. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biological Control* 116, 82-89.

Rossmann, A.Y. 1978. *Podonectria*, a genus in the Pleosporales on scale insects [Fungi]. *Mycotaxon* 7, 163-182.

Roy, H.E., Vega, F.E., Chandler, D., Goettel, M.S., Pell, J. & Wajnberg, E. (Eds.). 2010. *The ecology of fungal entomopathogens*. Dordrecht: Springer.

Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W., Maki, C.S., Araújo, W.L., Dos Santos, D.R. & Azevedo, J.L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences* 1(1), 24.

Russo, M.L., Pelizza, S.A., Cabello, M.N., Stenglein, S.A. & Scorsetti, A.C. 2015. Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). *Biocontrol Science and Technology* 25(4): 475-480.

Russo, M. L., Pelizza, S. A., Vianna, M. F., Allegrucci, N., Cabello, M. N., Toledo, A. V., ... & Scorsetti, A. C. 2018. Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. *Journal of King Saud University-Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.008>

Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M. & Sullivan, T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29(1), 319-343.

Saikkonen, K., Gundel, P. E. & Helander, M. 2013. Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 962-968.

Samson, J., Langlois, É., Lei, J., Piché, Y. & Chênevert, R. 1998. Removal of 2, 4, 6-trinitrotoluene and 2, 4-dinitrotoluene by fungi (*Ceratocystis coerulea*, *Lentinus lepideus* and *Trichoderma harzianum*). *Biotechnology Letters* 20(4), 355-358.

Sánchez Márquez, M., Bills, G.F. & Zabalgoitia, I. 2007. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity* 171-195.

Sánchez-Rodríguez, A.R., Raya-Díaz, S., Zamarreño, Á.M., García-Mina, J.M., del Campillo, M.C. & Quesada-Moraga, E. 2018. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control* 116: 90-102.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12), 5463-5467.

Sasan, R.K. & Bidochka, M.J. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany* 99(1), 101-107.

Saucedo-García, A., Anaya, A. L., Espinosa-García, F. J., & González, M. C. (2014). Diversity and communities of foliar endophytic fungi from different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz, Mexico. *PloS one* 9(6) e98454.

Schardl, C.L. & Craven, K.D. 2003. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology* 12(11), 2861-2873.

Schreiter, G., Butt, T.M., Beckett, A., Vestergaard, S. & Moritz, G. 1994. Invasion and development of *Verticillium lecanii* in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Mycological Research* 98(9), 1025-1034.

Schulz, B., Guske, S., Dammann, U. & Boyle, C. 1998. Endophyte–host interactions II. Defining symbiosis of the endophytehost interaction. *Symbiosis* 25: 213–227.

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.K., & Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106(9), 996-1004.

Scorsetti, A.C., Humber, R.A., García, J.J. & Lastra, C.C.L. 2007. Natural occurrence of entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) of aphid (Hemiptera: Aphididae) pests of horticultural crops in Argentina. *BioControl* 52(5), 641.

Scorsetti, A.C., Maciá, A., Steinkraus, D.C. & Lastra, C.L. 2010. Prevalence of *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales) infecting *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae) on lettuce crops in Argentina. *Biological Control* 52(1), 46-50.

Scorsetti, A.C., Jensen, A.B., Lastra, C.L. & Humber, R.A. 2012. First report of *Pandora neoaphidis* resting spore formation in vivo in aphid hosts. *Fungal Biology* 116(2), 196-203.

Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W. & Kendrick, B. 2011. The genera of Hyphomycetes (p. 997). Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

- Shah, F.A., Wang, C.S. & Butt, T.M. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters 251(2), 259-266.
- Shankar, B.N., Shashikala, J. & Krishnamurthy, Y.L. 2008. Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. Fungal Ecology 1:89–93.
- Sieber, T.N. & Dorworth, C.E. 1994. An ecological study about assemblages of endophytic fungi in *Acer macrophyllum* in British Columbia: in search of candidate mycoherbicides. Canadian Journal of Botany 72(10), 1397-1402.
- Sieber, T.N., Sieber-Canavesi, F. & Dorworth, C.E. 1991. Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. Canadian Journal of Botany 69(2), 407-411.
- Simpson, E.H. 1949. Measurement of diversity. Nature.
- Smith, RF & Reynolds, H.T. 1966. Principles, definitions and scope of integrated pest control. In: Symposium on Integrated Pest Control, Roma, 1966. Proceedings. Rome: FAO, 1966. p. 11-17.
- Spatafora, J. W., Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L., & White Jr, J. F. 2007. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. Molecular Ecology, 16(8), 1701-1711.
- Spurr, H.W. & Welty R.E. 1974. Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotiana* spp. Phytopathology 65:417-422.
- Srisukchayakul, P., Wiwat, C. & Pantuwatana, S. 2005. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. ScienceAsia 31, 273-276.
- Strobel, G. & Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(4), 491-502.
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S. & Hess, W.M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology 142(2), 435-440.

- Stuart, R.M., Romão, A.S., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L. & Araújo, W.L. 2010. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. *Archives of Microbiology* 192(4), 307-313.
- Sun, B.D. & Liu, X.Z. 2008. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Applied Soil Ecology* 39(1), 100-108.
- Sun, J.Q., Guo, L.D., Zang, W., Ping, W. & Chi, D.F. 2008. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. *Science China Life Sciences Series C*. 51, 751-759.
- Sunayana, N., Nalini, M.S., Sampath Kumara, K.K. & Prakash, H.S. 2014. Diversity studies on the endophytic fungi of *Vitex negundo* L. *Mycosphere* 5(4), 578-590.
- Sung, G.H., Poinar Jr, G.O. & Spatafora, J.W. 2008. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal-arthropod symbioses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49(2), 495-502.
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B. & Gopalan, V. 2013. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity* 54(1), 19-30.
- Tan, R.X. & Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 18(4), 448-459.
- Tefera, T. & Vidal, S. 2009. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl* 54(5), 663-669.
- Thakur A., Kaur S., Kaur A. & Singh V. 2012. Detrimental effects of endophytic fungus *Nigrospora* sp. on survival and development of *Spodoptera litura*. *Biocontrol Science and Technology* 22(2): 151-161.

- Tkaczuk, C., Król, A., Majchrowska-Safaryan, A., & Nicewicz, Ł. 2014. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. *Journal of Ecological Engineering* 15(4).
- Toledo, A.V., Franco, M.E., Medina, R., de Remes Lenicov, A.M.M. & Balatti, P.A. 2018. Assessment of the genetic diversity of Argentinean isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) using ISSR markers. *Journal of King Saud University-Science* doi.org/10.1016/j.jksus.2018.02.006
- Tomita, F. 2003. Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity* 14, 187-204.
- Toofanee, S.B. & Dulyamamode, R. 2002. Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. *Fungal Diversity* 11(1), 169-175.
- Van der Putten, W.H., Bardgett, R.D., de Ruiter, P.C., Hol, W.H.G., Meyer, K.M., Bezemer, T.M., Bradford, M.A., Christensen, S., Eppinga, M.B., Fukami, T., Hemerik, L., Molofsky, J., Schadler, M., Scherber, C., Strauss, S.Y., Vos, M. & Wardle, D.A. 2009. Empirical and theoretical challenges in aboveground–belowground ecology. *Oecologia* 161, 1–14.
- Van Driesche, R., Hoddle, M., Center, T. D., Ruíz, C.E., Coronada, B.J. & Manuel, A.J. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales (No. 632.96 V33). US Department of Agriculture, US Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team.
- Van Lenteren, J.C. 2014. IOBC Internet Book of Biological Control-Version 6. 2012.
- Van Lenteren, J.C. 1993. Integrated pest management: the inescapable trend. En: *Modern crop protection: Developments and perspectives*, p. 217-225.
- Vega, F. E., & Blackwell, M. (Eds.). 2005. *Insect-fungal associations: ecology and evolution*. Oxford University Press.
- Vega, F.E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 277–279.

- Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F. & Rehner, S.A. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological control* 46(1), 72-82.
- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S. & Pell, J.K. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2(4): 149-159.
- Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-ard, J.J. & Blackwell, M. 2012. Fungal entomopathogens. In *Insect Pathology (Second Edition)* (pp. 171-220).
- Vega, F.E. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia* 110(1), 4-30.
- Vidal, E. & Jaber, L.R. 2015. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Current Science* 109 (1): 46-54.
- Vieira, M.L., Hughes, A.F., Gil, V.B., Vaz, A.B., Alves, T.M., Zani, C.L. & Rosa, L.H. 2011. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology* 58(1), 54-66.
- Vojvodic, S., Boomsma, J.J., Eilenberg, J., & Jensen, A.B. 2012. Virulence of mixed fungal infections in honey bee brood. *Frontiers in Zoology* 9(1), 5.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor J., Becker K. & Fischer M., 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 102(38):13386–13391
- Wang, C. & Leger, R.J.S. 2005. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryotic Cell* 4(5), 937-947.
- Wang, J.B., Leger, R.S. & Wang, C. 2016. Advances in genomics of entomopathogenic fungi. In *Advances in genetics* 94, pp. 67-105. Academic Press.

- Weber, J. 1981. A natural control of Dutch elm disease. *Nature*, London, 292: 449-451.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S. & Vangronsveld J. 2009. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion Biotechnology* 20(2):248–254.
- Wilson, D. 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 274-276.
- Wynns, A.A., Jensen, A.B., Eilenberg, J. & James, R. 2012. *Ascospaera subglobosa*, a new spore cyst fungus from North America associated with the solitary bee *Megachile rotundata*. *Mycologia* 104(1), 108-114.
- Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R. K. & Bidochka, M. J. 2011. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology* 157(10), 2904-2911.
- Xiao, G., Ying, S.H., Zheng, P., Wang, Z.L., Zhang, S., Xie, X.Q., ...& Feng, M.G. 2012. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports* 2, 483.
- Yasem de Romero, M.G., Salvatore, A.R., López, G. & Willink, E. 2008. Presencia natural de hongos hyphomycetes en larvas invernantes de *Diatraea saccharalis* F. en caña de azúcar en Tucumán, Argentina. *Revista industrial y agrícola de Tucumán* 85(2), 39-42.
- Yeo, H., Pell, J.K., Alderson, P.G., Clark, S.J., & Pye, B. J. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* 59(2), 156-165.
- Zhang, H.W., Song, Y.C. & Tan, R.X., 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports* 23(5):753–771.

Zheng, Y.K., Qiao, X.G., Miao, C.P., Liu, K., Chen, Y.W., Xu, L.H. & Zhao, L.X., 2016. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Annals of Microbiology* 66(2), 529-542.

Zheng, P., Xia, Y., Zhang, S & Wang, C. 2013. Genetics of *Cordyceps* and related fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(7), 2797-2804.

Zhou, S-L.; Shu-Zhen, Y; Qi-Sha L. & Shuang-Lin C. 2014. Diversity of endophytic fungi associated with the foliar tissue of a hemi-parasitic plant *Macrosolen cochinchinensis*. *Current Microbiology* DOI 10.1007/s00284-014-0680-y.